

Untersuchungen zur Charakterisierung eines Purinozeptors und zur Expression von Komplementfaktoren des klassischen Aktivierungsweges in humanen Praeadipozyten

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)
DER NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT III
- BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN -
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von

Christian Kramheller

aus Regensburg

2001

Promotionsgesuch eingereicht am 29.05.2001.

Die Arbeit wurde angeleitet von Prof. Dr. G. Löffler.

Tag der mündlichen Prüfung: 26.07.2001.

Prüfungsausschuß:	Prof. Dr. G. Hauska	(Vorsitzender)
	Prof. Dr. G. Löffler	(1. Prüfer)
	Prof. Dr. A. Kurtz	(2. Prüfer)
	Prof. Dr. W. Minuth	(3. Prüfer)

Die Untersuchungen zu vorliegender Arbeit wurden unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Georg Löffler in der Zeit von Mai 1997 bis April 2001 am Institut für Biochemie, Genetik und Mikrobiologie der Universität Regensburg durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt

- an erster Stelle Herrn Prof. Dr. Georg Löffler für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit und seine ständige Diskussionsbereitschaft
- Herrn Dr. Martin Schmidt für die Unterstützung zu Beginn der Arbeit und die Antworten auf verschiedenste Fragen, auch nachdem er das Institut verlassen hatte
- Frau Dr. Marita Eisenmann-Klein (Krankenhaus St. Josef) und ihren Mitarbeitern für die zur Verfügung gestellten Fettgewebsproben
- Herrn PD Dr. Martin Wabitsch (Universität Ulm) für sein Einverständnis zur Untersuchung der von ihm etablierten humanen Praeadipozyten-Zelllinie
- Herrn Dr. Alexander Kappes für das Überlassen von Zelllysaten für Vorexperimente
- Herrn Dipl. Biochem. Markus Heitzer für die kompetente Korrektur des Textes
- Frau Gisela Pöll für ihre tatkräftige Mithilfe im Labor

Mein Dank gilt weiterhin

allen nicht explizit genannten derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern des Institutes, die zu einer angenehmen Arbeitsatmosphäre beitrugen.

**Meiner Mutter
und
für
Sabine**

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Das Fettgewebe	1
1.2.	P2X-Rezeptoren	3
1.2.1.	Allgemeines	3
1.2.2.	Strukturelle Aspekte von P2X-Rezeptoren	5
1.2.3.	Pharmakologische Charakterisierung von P2X-Rezeptoren	8
1.2.4.	Lokalisation von P2X-Rezeptoren	8
1.2.5.	Hinweise auf einen P2X-Rezeptor auf Stromazellen des humanen Fettgewebes	9
1.3.	Das Komplementsystem	11
1.3.1.	Begriff	11
1.3.2.	Funktionelle Klassifizierung der Komplementfaktoren	11
1.3.3.	"Pathways" des Komplementsystems	12
1.3.4.	Der klassische Aktivierungsweg	13
1.3.5.	Die Komplementfaktoren des klassischen Aktivierungsweges	14
1.3.6.	Fettgewebe und Komplementsystem	16
1.4.	Aufgabenstellung	17
2.	Material und Methoden	18
2.1.	Chemikalien	18
2.1.1.	Allgemeine Chemikalien und Verbrauchsmaterial	18
2.1.2.	Puffer und Lösungen	19
2.1.3.	Enzyme	20
2.1.4.	Antikörper	20
2.1.5.	Kits	20
2.2.	Bakterienstämme, Hefestämme, Zellen, Vektoren und Oligonukleotide	20
2.2.1.	Bakterienstämme und Bakterienmedien	20
2.2.2.	Hefestämme, Medien und Medienzusätze	21
2.2.3.	Zellen und Medien für die Zellkultur	22
2.2.4.	Vektoren und Oligonukleotide	22
2.3.	Geräte	24
2.4.	Zellkultur	25
2.4.1.	Isolierung von Stromazellen des humanen Fettgewebes	25
2.4.2.	Kultivierung und Subkultivierung von Stromazellen des humanen Fettgewebes	25
2.4.3.	Umstellen auf serumfreie Bedingungen	26
2.4.4.	Serumfreie Aufzucht und Differenzierung primärkultivierter humaner Praeadipozyten	26
2.5.	Charakterisierung der Zellen	26
2.5.1.	Zellernte für die Bestimmung der Gesamtproteinmenge und der spezifischen GPDH-Aktivität	27
2.5.2.	Bestimmung der Gesamtproteinmenge nach Bradford	27
2.5.3.	Bestimmung der spezifischen GPDH-Aktivität	27

2.5.4.	Bestimmung der Aromatase-Aktivität	28
2.6.	Molekularbiologische Methoden	28
2.6.1.	Isolierung von Nukleinsäuren	28
2.6.1.1.	Isolierung von Gesamt-RNA aus Stromazellen des humanen Fettgewebes	28
2.6.1.2.	Reinigung von polyA ⁺ -RNA	29
2.6.1.3.	Isolierung von Plasmid-DNA aus E. coli	29
2.6.1.4.	Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefen	29
2.6.1.5.	Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA	30
2.6.1.6.	Gelelektrophoretische Reinigung von DNA	30
2.6.2.	Enzym-katalysierte Modifizierungen von DNA	31
2.6.2.1.	Verdau von DNA mit Restriktionsenzymen	31
2.6.2.2.	Behandlung von DNA-Enden mit Klenow-Polymerase	31
2.6.2.3.	Behandlung von DNA-Enden mit T4-DNA-Polymerase	31
2.6.3.	Klonierung von DNA	32
2.6.3.1.	Präparation von Vektoren	32
2.6.3.2.	Klonierung von PCR-Fragmenten	32
2.6.3.2.1.	Klonierung über kohäsive Enden	32
2.6.3.2.2.	Klonierung über bündige Enden	32
2.6.3.3.	Ligation	32
2.6.3.4.	Transformation von E. coli	33
2.6.3.4.1.	Hitzeschock-Transformation von E. coli	33
2.6.3.4.2.	Transformation von E. coli durch Elektroporation	33
2.6.4.	Konstruktion der cDNA-Bänke	34
2.6.5.	Two-Hybrid-Screening	35
2.6.5.1.	Transformation von Hefen	35
2.6.5.2.	Screening	35
2.6.5.3.	Galaktosidase-Assay	35
2.6.6.	Transfer von Nukleinsäuren auf Filtermembrane	36
2.6.6.1.	Southern-Blot	36
2.6.6.2.	Northern-Blot	36
2.6.7.	Herstellung Digoxigenin-markierter DNA-Sonden	36
2.6.8.	Hybridisierung trägergebundener Nukleinsäuren und Detektion	37
2.6.9.	PCR	37
2.6.9.1.	DNA als Template	37
2.6.9.2.	RT-PCR	38
2.6.9.3.	Semiquantitative RT-PCR	38
2.6.9.3.1.	Zellyse	38
2.6.9.3.2.	Reverse Transkription	39
2.6.9.3.3.	PCR und Detektion	39
2.6.10.	Sequenzierung von Doppelstrang-DNA	39
2.7.	Proteinchemische Methoden	39
2.7.1.	Präparation von Protein-Extrakten aus Hefen	39
2.7.2.	SDS-PAGE nach Laemmli	40
2.7.3.	Silberfärbung von Gelen	40
2.7.4.	Western-Blotting	40
2.8.	Immunologische Methoden	41
2.8.1.	Immundetektion von Komplementfaktoren	41
2.8.2.	Immundetektion von Fusionsproteinen in Hefen	41

3.	Ergebnisse	42
3.1.	Der Purinozeptor auf Stromazellen des humanen Fettgewebes	42
3.1.1.	Klonierung des Bait-Konstruktes für den Two-Hybrid-Assay	42
3.1.2.	Konstruktion der cDNA-Banken	47
3.1.2.1.	Charakterisierung der verwendeten Zellpräparationen	47
3.1.2.2.	Charakterisierung der verwendeten polyA ⁺ -RNA	48
3.1.2.3.	Konstruktion der cDNA-Banken	49
3.1.2.4.	Charakterisierung der cDNA-Banken	51
3.1.2.4.1.	Allgemeines	51
3.1.2.4.2.	Analyse der Insertgrößen	52
3.1.2.4.3.	Der P2X1-Rezeptor ist in der cDNA-Bank 1 repräsentiert	54
3.1.3.	Two-Hybrid-Screening der cDNA-Bank 1	55
3.1.3.1.	Expression des Baits	56
3.1.3.2.	Two-Hybrid-Assays	58
3.1.3.3.	Klon K37/2	59
3.1.4.	Isolierung des fehlenden P2X1-Fragmentes	60
3.2.	Komplementfaktoren des klassischen Aktivierungsweges in humanen Praeadipozyten	62
3.2.1.	Nachweis der C1s-mRNA durch Northern-Blot-Technik	62
3.2.2.	Nachweis weiterer Komplementfaktoren des klassischen Aktivierungsweges in der cDNA-Bank 1	63
3.2.3.	Die mRNA dieser Komplementfaktoren ist nur in Praeadipozyten nachweisbar, nicht in reifen Adipozyten	64
3.2.4.	Nachweis der Translation und Sekretion der Komplementfaktoren C1s und C1r in humanen Praeadipozyten	66
3.2.5.	Verifizierung der Expression von C1s, C1r, C2 und C4 in humanen Praeadipozyten	68
3.2.6.	Differenzierungsabhängige Expression der nachweisbaren Komplementfaktoren in humanen Praeadipozyten	70
3.2.6.1.	Optimierung einer RT-PCR zum semiquantitativen Nachweis der Komplementfaktoren	70
3.2.6.2.	Differenzierungsabhängige Expression der Faktoren C1s und C1r	73
3.2.6.2.1.	Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCR	73
3.2.6.2.2.	Differenzierungsabhängiger Nachweis der Komplementfaktoren C1s und C1r durch Western-Blot-Technik	75
3.2.6.3.	Differenzierungsabhängige Expression der Faktoren C2 und C4	76
3.2.7.	Einfluss äußerer Faktoren auf die Expression von C1s und C1r	78
3.2.7.1.	Einfluss der Induktoren Cortisol und IBMX auf die Expression von C1s und C1r	78
3.2.7.2.	Einfluss von TNF α auf die Expression von C1s und C1r	79
4.	Diskussion	82
4.1.	Der Purinozeptor auf Stromazellen des humanen Fettgewebes	82
4.2.	Expression von Komplementfaktoren des klassischen Aktivierungsweges in humanen Praeadipozyten	86
5.	Zusammenfassung	92
6.	Literaturverzeichnis	94

Abkürzungsverzeichnis

Ø	Durchmesser
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
AMP	Adenosinmonophosphat
AP	Alkalische Phosphatase
ATP	Adenosintriphosphat
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumine
cDNA	complementary Deoxyribonucleic acid
cfu	colony forming units
CSPD	3-(4-Methoxyspiro{1,2-dioxetan-3,2-(5'chloro)tricyclo[3.3.1.1] decan}-4-yl)phenylphosphat, Dinatriumsalz
CTP	Cytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Dig	Digoxigenin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNase	Desoxyribonuclease
dNTP	desoxy-Nucleosid-5'-triphosphat
dpm	desintegrations per minute
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
GPDH	Glycerol-3-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IBMX	3-Isobutyl-1-methyl-xanthin

kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
MCS	Multiple cloning site
α,β -meATP	α,β -Methylen-ATP
β,γ -meATP	β,γ -Methylen-ATP
2-MeSATP	2-Methylthio-adenosintriphosphat
min	Minute
MOPS	3-[N-Morpholino]-propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid, reduziert
NP40	Nonidet-P40
OD _x	Optische Dichte bei x nm
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PPADS	Pyridoxal-phosphat-6-azophenyl-2',4'-disulfonsäure
RNA	Ribonucleic acid
rRNA	ribosomale RNA
RNase	Ribonuclease
rpm	rotations per minute
RT	Reverse Transkription
s	Sekunde
SDS	Sodium dodecyl sulphate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis
SEM	Standard error of the mean
Taq	Thermus aquaticus
TE	Tris-EDTA
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNP-ATP	2',3'-O-(2',4',6')-trinitrophenyl-ATP
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
VT	Volumenteile
w/v	weight per volume
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galacto-pyranosid

1. Einleitung

1.1. Das Fettgewebe

Das Fettgewebe als Bindegewebsform besteht zu bis zu zwei Dritteln aus reifen Adipozyten, die durchsetzt sind von verschiedenen anderen Zelltypen, beispielsweise Praeadipozyten in unterschiedlichen Differenzierungsphasen und Fibroblasten [1]. Diese Adipozyten werden oft von kollagenen und elastischen Fasern in Fettgewebslappchen vereint.

In normalgewichtigen Menschen macht das Fettgewebe 8-20kg aus [2], wobei diese Masse durch das Nahrungsangebot reguliert wird, was die Hauptaufgabe dieses Organs impliziert: Das Fettgewebe speichert Energie in Form von Triacylglycerolen bei Brennstoffüberfluss, bei Nahrungsmangel werden diese Brennstoffe als Fettsäuren freigesetzt.

Außerdem dient das Körperfett der Wärmeisolierung, polstert bestimmte Organe und federt mechanische Stoßwirkungen ab. Die Thermogenese ist eine Besonderheit des braunen Fettgewebes, das sich aus plurivakuolären Fettzellen mit mehreren Fettröpfchen und vielen Mitochondrien zusammensetzt, während die Adipozyten des weißen Fettgewebes als univakuolär zu charakterisieren sind [2]. Die Expression des Protonenkanals Thermogenin (UCP1) in Adipozyten des braunen Fettgewebes führt hier zur Entkopplung von Protonengradient und ATP-Synthese bei der oxidativen Phosphorylierung in der mitochondrialen Atmungskette, wobei die frei werdende Energie als Wärme abgeführt wird [3].

Darüberhinaus ist in den letzten Jahren die Funktion des Fettgewebes als endokrines Organ, das eine Reihe von Hormonen und anderen Signalmolekülen synthetisiert und sezerniert, immer deutlicher geworden [4]. An dieser Stelle erwähnt seien die Produktion von Zytokinen (TNF α , IL-6) [5], ASP (acylation stimulating protein) [6], Angiotensin II [7], sowie die Sekretion der Proteohormone Leptin, das eine wichtige Rolle bei der Regulation des Körpergewichtes spielt [8], und Resistin, welches als Bindeglied zwischen Adipositas (siehe unten) und Diabetes diskutiert wird [133].

Die pathologische Vermehrung der Fettgewebssmasse wird als Adipositas bezeichnet und hat ihre Ursache meist in einer dauerhaft positiven Energiebilanz, die sich aus einer hohen Energiezufuhr bei fettreicher Überernährung und gleichzeitig reduziertem Energieverbrauch in Folge verringerter körperlicher Betätigung ergibt [9]. Die Adipositas wird anhand des BMI (body mass index) diagnostiziert und charakterisiert und ist insofern problematisch, als sie an der Entstehung des metabolischen Syndroms beteiligt ist [10]. Auf zellulärer Ebene ist diese eklatante Zunahme der Fettgewebssmasse zum einen in der Vergrößerung reifer Adipozyten in Folge vermehrter Lipideinlagerung begründet (Hypertrophie). Zum anderen werden bei der

1. Einleitung

hyperplastischen Adipositas vermehrt Adipozyten aus dem im Fettgewebe vorhandenen Pool an Praeadipozyten rekrutiert, diese werden zur Zellvermehrung und Differenzierung in Adipozyten angeregt [1], was sich wiederum in einer Zunahme der Fettgewebssmasse niederschlägt.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen mit den humanen Praeadipozyten diese fibroblastenartigen Vorläuferzellen reifer Adipozyten, in welchen mit der Aromatase (Cytochrom P-450_{Arom}) das Enzym lokalisiert ist [11, 12], das das Fettgewebe für Männer und postmenopausale Frauen zur Hauptquelle zirkulierender Estrogene werden lässt [13]. Der potenzierende Effekt von ATP bei der Aromataseinduktion durch Cortisol und PDGF in Stromazellen des humanen Fettgewebes [14] deutete auf die Existenz eines Purinozeptors, dessen nähere Charakterisierung hier vorangetrieben werden sollte. Außerdem wurden während dieser Arbeit erlangte Indizien für die Expression von Komplementfaktoren des klassischen Aktivierungsweges aufgegriffen und näher untersucht.

1.2. P2X-Rezeptoren

1.2.1. Allgemeines

Die Funktionen von Adenosin-5'-triphosphat (ATP) im Organismus sind mannigfaltig, wobei zwischen den Wirkungen von intrazellulärem und extrazellulärem ATP differenziert werden muss. Intrazellulär erlangt ATP besondere Bedeutung als energiereiche Verbindung im Stoffwechsel und spielt eine Rolle bei der Nukleinsäuresynthese und der Regulation von Enzymen. Aber bereits kurz nach der Entdeckung und Reinigung des ATP beschrieben Drury und Szent-Gyorgyi [15] den Effekt von extrazellulärem ATP auf das cardiovaskuläre System. Der dort beschriebene gefäßerweiternde Effekt von extrazellulärem ATP ist zwar in der Zwischenzeit einem Abbauprodukt des ATP, dem Adenosin, zugeordnet worden, war aber dennoch der auslösende Impuls dafür, dass seitdem in Studien die verschiedensten Wirkungen von extrazellulärem ATP und anderen Nukleotiden auf intakte Organe, isolierte Gewebe und Zellkulturen untersucht wurden [16].

In vivo kann ATP auf unterschiedlichem Wege in den Extrazellulärraum der entsprechenden Gewebe gelangen. Zum einen wird ATP in exocytotischen Vesikeln oft in stöchiometrischen Mengen mit Neurotransmittern in den synaptischen Spalt transloziert [17] und kann dort auch als Neurotransmitter fungieren [18]. Zum anderen kann ATP nach Verletzung der Zellmembran aus dem Cytosol, wo es in millimolaren Konzentrationen vorliegt, in den Extrazellulärraum diffundieren. Darüberhinaus ist die hypoxie-induzierte Freisetzung von ATP aus dem Cytosol intakter Zellen über spezielle Transporter beschrieben worden [19]. Die Tatsache, dass an der Außenseite der Plasmamembran sehr effiziente Ectonukleotidasen und 5'-Nukleotidasen existieren, erklärt die Kurzlebigkeit von Nukleotiden im extrazellulären Raum. ATP wird dabei bis zum Adenosin abgebaut [20].

Vermittelt werden die Wirkungen von extrazellulärem ATP von einer Gruppe membranständiger Proteine, die man als P2-Rezeptoren bezeichnet [16] und formal von den P1-Rezeptoren (Adenosin-Rezeptoren) abgrenzt. Beide Gruppen werden unter dem Begriff "Purinozeptor" zusammengefasst. P2-Rezeptoren lassen sich unter Beachtung von Sequenz-Homologien und aufgrund ihrer nachgeschalteten Signaltransduktions-Mechanismen in zwei Hauptklassen, die P2X-Rezeptoren und die P2Y-Rezeptoren, einteilen. Der Gruppe der P2X-Rezeptoren sind bis heute 7 Proteine (P2X1 bis P2X7) zuzuordnen, wobei es sich um ligandgesteuerte Ionenkanäle handelt [21], die für Na^+ , K^+ und in geringem Maße für Ca^{2+} -Ionen permeabel sind [22]. Demgegenüber steht die Gruppe der P2Y-Rezeptoren, die als G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aufzufassen sind [23]. Der

1. Einleitung

ursprünglich als P2Z-Rezeptor diskutierte Vertreter einer von diesen beiden P2-Untergruppen unabhängigen Rezeptor-Familie [24] wurde nach seiner Sequenzierung als weiterer P2X-Rezeptor (P2X7) identifiziert [25].

Die genaue Anzahl von physiologisch aktiven P2X-Rezeptorkomplexen ist unklar. Fest steht, dass alle bisher bekannten Untereinheiten außer P2X6 funktionelle Homooligomere unbekannter Stöchiometrie bilden, wobei P2X1- und P2X3-Untereinheiten auch als stabile Homotrimere vorkommen [22]. Weiterhin wurde die Funktionalität von Heterooligomeren aus den Untereinheiten P2X1/P2X5 [26, 27, 28], P2X2/P2X3 [29], P2X4/P2X6 [30] und P2X2/P2X6 [31] nachgewiesen. Darüber hinaus konnte mit Hilfe von Immunpräzipitationstechniken gezeigt werden, dass weitere sieben Kombinationen verschiedener Untereinheiten Heterooligomere bilden können [32]. Die Tatsache, dass Splice-Varianten unter anderem für die Untereinheiten hP2X1 [33], hP2X2 [34] und hP2X4 [35] beschrieben sind, erhöht die Zahl der möglichen nativen P2X-Rezeptorkomplexe, zumal auch die Bildung von Rezeptoren aus verschiedenen Splice-Varianten ein und derselben Untereinheit beschrieben ist [36].

Gene für P2X-Rezeptoren wurden auf drei verschiedenen Chromosomen lokalisiert. Das Gen für hP2X3 ist auf Chromosom 11q12 lokalisiert [37], der Genort für hP2X5 wurde mit 17p13.3 [33] bestimmt, wo bereits das Gen für hP2X1 lokalisiert worden war [38]. Mit Chromosom 12q24 besitzen hP2X4 [39] und hP2X7 [40] ebenfalls den gleichen Genort, sodass auch Gene für P2X-Rezeptoren in Clustern, wie man sie von Genen anderer Rezeptoren her kennt, angeordnet sein können.

Die Aktivierung sowohl von P2X- als auch von P2Y-Rezeptoren geht einher mit einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration. Diese Calcium-Ionen scheinen bei der Aktivierung von P2X-Rezeptoren aus extrazellulären Depots rekrutiert zu werden [16], wobei der Einstrom von Na^+ -Ionen jedoch auch die Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus intrazellulären Depots induzieren könnte. Die Calcium-Ionen bei der Aktivierung von P2Y-Rezeptoren stammen dagegen aus intrazellulären Depots und werden Inositoltrisphosphat vermittelt freigesetzt, wie beispielsweise in humanen Haut-Fibroblasten beschrieben [41].

1.2.2. Strukturelle Aspekte von P2X-Rezeptoren

Die Isolierung der ersten P2X-Rezeptoren fand ihren Ausgangspunkt in der Beobachtung, dass ATP in *Xenopus* Oocyten, in die RNA aus vas deferens bzw. Harnblase der Ratte injiziert worden war, einwärts gerichtete Ströme induziert. Nach Konstruktion der entsprechenden cDNA-Banken und ihrem Screening durch Injektion der in-vitro-Transkripte in *Xenopus* Oocyten wurden Sequenzen für *rP2X1* aus vas deferens der Ratte [42] und *rP2X2* aus PC12-Zellen [43] erhalten. Sequenzinformationen für die homologen Gene *rP2X3* [44], *rP2X4* [45], *rP2X5* [46], *rP2X6* [47] und *rP2X7* [25] wurden durch Screening von cDNA-Banken, PCR-Techniken oder einer Kombination dieser beiden Methoden erhalten. Mit der Klonierung der humanen Gene *hP2x1* bis *hP2X7* [38, 34, 37, 39, 48, 47, 49] wurde die Charakterisierung der P2X-Rezeptoren auf molekularer Ebene vorangetrieben (Abbildung 1.1).

Die Analyse dieser Primärstrukturen lieferte in Verbindung mit verschiedenen anderen experimentellen Befunden die Vorstellung von der Struktur eines P2X-Rezeptors als membranständiges Protein mit zwei Transmembrandomänen, die über einen relativ großen extrazellulären Loop miteinander verbunden sind, wobei N- und C-Terminus intrazellulär lokalisiert sind (Abbildung 1.2). Diese Topologie grenzt die Familie der P2X-Rezeptoren eindeutig von anderen Ionenkanälen, wie z. B. Glutamat-Rezeptoren oder nikotinischen Acetylcholin-Rezeptoren ab [50] und wird unter anderem von folgenden Evidenzen gestützt: Hydrophobizitäts-Plots der Primärstrukturen weisen zwei hydrophobe Abschnitte (M1, M2 in Abbildung 1.2) aus, die lang genug sind, um durch die Lipiddoppelschicht der Plasmamembran zu reichen [21, 42, 43]. Weiterhin spricht das Fehlen eines Signalpeptides für eine intrazelluläre Lokalisation von N- und C-Terminus [33]. Außerdem deuten Mutationsexperimente am postulierten extrazellulären Loop, die sich in veränderten Agonistenpräferenzen [51] bzw. in unterschiedlichen Antagonisten-Effekten [47, 39, 52] niederschlagen, daraufhin, dass dieser Loop tatsächlich extrazellulär lokalisiert ist. Die Tatsache, dass der in vitro-translatierte *rP2X1*-Rezeptor glykosiliert vorliegt und diese Glykosylierung durch Punktmutation dem Asparagin-Rest N184 im Loop zugewiesen werden konnte [21], spricht ebenfalls für dessen postulierte Lage.

[illegible]

Abbildung 1.1: Aminosäuresequenzen der klonierten humanen P2X-Rezeptoren [33, modifiziert]. Identische bzw. konservierte Aminosäuren sind in Kästen zusammengefasst, die beiden postulierten Transmembrandomänen M1 und M2 sind überstrichen. Rechtecke kennzeichnen die 10 konservierten Cystein-Reste, der Kreis markiert eine konservierte Glykosilierungs-Stelle.

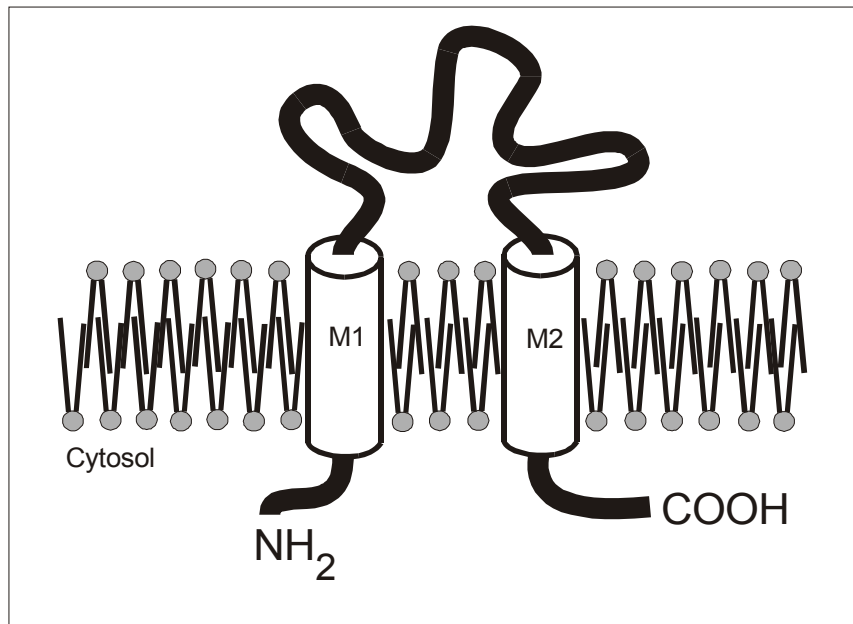


Abbildung 1.2: Topologie eines P2X-Rezeptors. Erklärung siehe Text.

Der extrazelluläre Loop enthält mehrere konservierte Aminosäuren, meist Glycin oder Lysin, die in Anbetracht der Tatsache, dass eine consensus-Sequenz für die Bindung von ATP fehlt, an der Konstitution der Ligand-Bindestelle beteiligt sein könnten [21]. Außerdem weist er zehn in allen bekannten P2X-Rezeptoren konservierte Cystein-Reste auf, die über die Ausbildung von Disulfid-Brücken an der Stabilisierung der Tertiärstruktur beteiligt sein könnten [33].

Im Vergleich zu anderen Ionenkanal-Familien unterscheiden sich die bekannten P2X-Rezeptoren relativ stark in der Aminosäuresequenz ihrer hypothetischen Transmembrandomänen, was an und für sich gegen eine Beteiligung dieser Abschnitte an der Bildung des eigentlichen Kanals spricht. Die Transmembrandomäne M2 (Abbildung 1.2) jedoch zeichnet sich dadurch aus, dass jede dritte Aminosäure entweder eine relativ kleine oder polare Seitenkette trägt, was für die Bildung einer amphipatischen α -Helix sprechen [43] und eine Porenbildung erklären könnte. Rassendren et al. [53] konnten aber zeigen, dass bestimmte Aminosäuren der Transmembrandomäne M2 zwar an der Bildung der Pore beteiligt sind, diese jedoch nicht als amphipatische α -Helix, wie man sie beim nikotinischen Acetylcholin-Rezeptor findet [54], aufgefasst werden kann.

Der C-terminale Abschnitt, der keine Homologien unter den P2X-Rezeptoren aufweist, ist intrazellulär lokalisiert, so dass eine Wechselwirkung mit cytosolischen Proteinen nicht ausgeschlossen werden kann, beim rP2X₂-Rezeptor enthält er beispielsweise ein Prolin-reiches Motiv, das als SH3-Bindedomäne gedeutet werden kann [55].

1.2.3. Pharmakologische Charakterisierung von P2X-Rezeptoren

Bis heute sind nur Nukleotide als Agonisten für diese Gruppe von Ionenkanälen als Liganden bekannt, wobei ihre Aktivierung auf molekularer Ebene in keiner Weise verstanden ist. ATP aktiviert alle bisher bekannten P2X-Rezeptoren, während ADP nur als Agonist für P2X1 gelten kann und keiner der bekannten Rezeptoren von AMP bzw. Adenosin aktiviert wird. Pyrimidinnukleotide stellen keine besonders guten Liganden für P2X-Rezeptoren dar, am ausgeprägtesten ist noch der Effekt von CTP auf P2X3 [56].

Viele synthetische ATP-Analoga wie zum Beispiel 2-MeSATP, α,β -meATP und β,γ -meATP stellen sehr gute Agonisten dar, wobei sich β,γ -me-L-ATP zusätzlich durch seine hohe Spezifität für P2X-Rezeptoren auszeichnet [30].

Unter den bekannten Antagonisten für P2X-Untereinheiten finden sich sowohl solche, die sich von Nukleotiden ableiten lassen, als auch Stoffe mit anderer molekularer Struktur. Trinitrophenylsubstituierte Nukleotide, wie zum Beispiel TNP-ATP, sind potente Antagonisten für nahezu alle beschriebenen P2X-Rezeptoren [57], während die meisten Antagonisten ohne Nukleotid-Basis auf Suramin und PPADS zurückzuführen sind. Darüber hinaus existieren für die einzelnen P2X-Rezeptoruntereinheiten verschiedenste mehr oder weniger spezifische Antagonisten, beispielsweise inhibiert Coomassie Brilliant Blue G rP2X7 bei Konzentrationen im nanomolaren Bereich [58].

1.2.4. Lokalisation von P2X-Rezeptoren

Rezeptorvermittelte Wirkungen von extrazellulärem ATP wurden für die verschiedensten Gewebe und Zelllinien beschrieben (zur Übersicht [16]) und in der Tat wurde in bisher jedem untersuchten Gewebe zumindest ein Mitglied der P2X-Familie nachgewiesen, so dass P2X-Rezeptoren die am häufigsten vorkommenden ligandgesteuerten Ionenkanäle sind [33].

Am besten untersucht ist die Lokalisation von P2X-Rezeptoren in verschiedenen Geweben der Ratte:

Im Zentralnervensystem der Ratte wurden durch in situ-Hybridisierung rP2X4 [45, 52] und rP2X6 [47, 59] als die Hauptvertreter der P2X-Familie identifiziert, wobei sich für viele Teile des Gehirns überlappende Expressionsbereiche finden. Auch die mRNA für rP2X2 und rP2X5 wurde in bestimmten Regionen des Gehirns der Ratte, z. B. in der Glandula pinealis, nachgewiesen [47, 46]. Weiterhin wurde durch Northern Blot-Technik die Transkripte für rP2X7 im Gehirn nachgewiesen, bei dieser Untereinheit geht man aber davon aus, dass ihre Expression auf die Mikroglia beschränkt ist [49], dies gilt im übrigen auch für hP2X7.

1. Einleitung

Die in vielen Regionen des Gehirns beobachtbare Coexpression von rP2X4 und rP2X6 findet man in den peripheren Geweben nicht. Im Gegensatz zu rP2X4 [60] und rP2X1 [42] ist rP2X6 in Thymus, auf Blutgefäßen und vas deferens nicht nachweisbar. Die Infertilität männlicher P2X1-knockout-Mäuse geht auf die verminderte Kontraktibilität des vas deferens zurück, wobei dessen kontraktile Antwort auf Stimulierung durch das sympathische Nervensystem um bis zu 60% reduziert ist [61]. rP2X1-Untereinheiten finden sich außerdem auf glatten Muskelzellen, wobei die Effekte der verschiedenen P2X-Agonisten auf glatte Muskelzellen sehr gut mit dem Ligandenprofil des homomeren rP2X1 übereinstimmen [62]. Aufgrund der Tatsache, dass in diesen aber auch rP2X4 nachgewiesen wurde [59], müssen kompliziertere Verhältnisse zugrunde gelegt werden. rP2X4 wird außerdem zusammen mit rP2X2 in den Hypophysenvorderlappen [43, 60] der Ratte exprimiert.

Transkripte für rP2X3 wurden durch Northern Blot-Technik und in situ-Hybridisierungen ausschließlich auf sensorischen Ganglien lokalisiert [44, 47], wobei seine Expression in der Rückenmarkswurzel auf bestimmte Ganglien beschränkt ist, von denen einige auch Nozizeptor-assoziierte Marker exprimieren [44]. Dies spricht für eine Beteiligung des P2X3-Rezeptors am Entstehen von Schmerz [23], wobei jedoch wiederum nicht außer Acht gelassen werden darf, dass auch andere P2X-Rezeptoruntereinheiten auf sensorischen Ganglien und Rückenmark nachgewiesen wurden [47].

1.2.5. Hinweise auf einen P2X-Rezeptor auf Stromazellen des humanen Fettgewebes

Im Rahmen von Untersuchungen zur Regulation der Aromataseaktivität in Stromazellen des humanen Fettgewebes beschrieb Martin Schmidt in seiner Dissertation [63] einen potenzierenden Effekt bestimmter Nukleotide auf die Aromataseinduktion durch Cortisol und PDGF-BB.

Die Aromatase (Cytochrom P-450_{Arom}), das Schlüsselenzym der Estrogenbiosynthese, ist an der cytosolischen Seite der Membran des Endoplasmatischen Reticulums lokalisiert [64] und bindet dort Androgene, wie zum Beispiel Testosteron, die sie durch Katalyse einer Kaskade von drei Reaktionen in die entsprechenden Estrogene, im Falle des Testosterons also in Estradiol, umwandelt. Bei der Bildung von 1mol Estrogen werden 3mol Sauerstoff und 3mol NADPH verbraucht, als Coenzym fungiert ein Flavoprotein, die NADPH-Cytochrom P-450 Reduktase, die im Endoplasmatischen Reticulum der meisten Zelltypen ubiquitär ist [65].

1. Einleitung

Die Aromatase wurde in allen bis zu diesem Zeitpunkt untersuchten Vertebratenarten nachgewiesen, sie wird dort allerdings nur in wenigen Geweben exprimiert, wobei das Gehirn, die Reproduktionsorgane, wie die Ovarien, die Leydigzellen der Hoden und die Placenta als solche bekannt sind [63]. Im humanen Fettgewebe wird unabhängig vom Geschlecht der Probanden ebenfalls Aromataseaktivität detektiert, wobei gezeigt werden konnte, dass die Aromataseaktivität hier in den Stromazellen lokalisiert ist, während sich in Adipozyten nur geringe Aktivität nachweisen lässt [66, 11]. In kultivierten Stromazellen wird Cortisol in Gegenwart von Serum als Aromataseinduktor beschrieben [67], in Abwesenheit von Serum ist die stark induktive Wirkung von db-cAMP bekannt [68], ebenso die Potenzierung dieses Effektes durch Phorbol ester [69] bzw. durch PDGF in Gegenwart von Cortisol [70].

Wird Aromataseaktivität durch Cortisol und PDGF induziert, so kann dieser Effekt durch Purinnukleotide dosisabhängig potenziert werden, maximal ist eine Verdopplung bis Verdreifachung der Aromataseaktivität zu beobachten. Schmidt und Löffler [14] konnten zeigen, dass:

- a) diese Nukleotide nicht zur Aktivierung von P1-Purinozeptoren führen.
- b) die pharmakologische Charakterisierung auf die Existenz eines P2-Purinozeptors auf Stromazellen des humanen Fettgewebes hindeutet.
- c) die Wirksamkeit entsprechender Agonisten nicht in Einklang zu bringen ist mit Ligandenprofilen bis dahin pharmakologisch klassifizierter Purinozeptoren, sich jedoch mit der Agonistenpräferenz des P2X1-Rezeptors die größten Übereinstimmungen ergeben.
- d) dass die Purinnukleotide Calciumtransienten auslösen, wobei das mobilisierte Calcium aus intrazellulären Depots zu stammen scheint.

Eine mögliche Funktion des Purinozeptors auf Stromazellen des humanen Fettgewebes könnte in der Erhöhung der Aromataseaktivität und der damit vermehrten Bildung von Estrogenen in Folge gesteigerter Aktivität des sympathischen Nervensystems gesehen werden, wo der physiologische Ursprung des Liganden ATP liegen könnte [14]. Auch die Regulation der Lipolyse durch ATP aus sympathischen Nerven wird in diesem Zusammenhang diskutiert [14].

In der Folgezeit ist es Johanna Dammeier gelungen, ein Fragment des hP2X1-Rezeptors (*accession number* XM 008506, Basen 737-1051; Aminosäuren 1189-292) aus Stromazellen des humanen Fettgewebes zu isolieren [71].

1.3. Das Komplementsystem

1.3.1. Begriff

Der Begriff Komplement wurde im Zusammenhang mit dem Immunsystem zum erstenmal 1909 von Ehrlich und Morgenroth verwendet [72], die bei Untersuchungen zur Hämolyse von Erythrozyten durch das Serum immuner Tiere feststellten, dass hierbei zwei Faktoren eine Rolle spielten. Zum einen war eine hitzebeständige Komponente des Serums erforderlich, die sie "Antikörper" nannten, zum anderen war für diese Hämolyse aber auch ein hitzeempfindlicher Bestandteil des Serums notwendig, den sie als "Komplement" bezeichneten. Unabhängig von dieser erstmaligen Verwendung des Begriffes war es aber Bordet, der zur gleichen Zeit das Prinzip einer Komplementbindungsreaktion beschrieb und dabei die Bedeutung des Komplementes bei der Zellyse erkannte [72], sodass gemeinhin ihm die Entdeckung des Komplementsystems zugeschrieben wird.

Heute wird der Begriff Komplement als Sammelbezeichnung für Serum- und Zelloberflächenproteine verwendet, die als Bestandteile eines funktionalen Systems mit oder ohne Beteiligung von Antikörpern Antigene inaktivieren können. Die einzelnen Proteine werden dabei als Komplementfaktoren bezeichnet.

1.3.2. Funktionelle Klassifizierung der Komplementfaktoren

Die Klonierung der Gene für die einzelnen Komplementfaktoren und aus diesen Sequenzinformationen abgeleitete Strukturmodelle verfestigten die Vorstellung vom modularen Aufbau dieser Proteine und führten zu ihrer Einteilung in fünf funktionelle Gruppen [72]:

a) C1q und die Collectine

Der Komplementfaktor C1q ist aus 18 Untereinheiten aufgebaut, die kollagen-ähnliche Tripel-Helices mit globulären Domänen an den Spitzen [73] ausbilden, über die die Wechselwirkung mit Immunglobulinen erfolgt. Einen ähnlichen Aufbau besitzen die unter dem Begriff Collectine vereinten Serumproteine MBL und Conglutinin, sowie die Proteine SP-A und SP-D auf der Lungenoberfläche.

b) Serinproteasen

Bei den Enzymen des Komplementsystems handelt es sich um Serinproteasen, die durch die Bildung einer katalytischen Triade unter Beteiligung der Aminosäurereste von Histidin, Serin und Aspartat charakterisiert sind [74].

1. Einleitung

c) Proteine der C3-Familie

Zu dieser Gruppe werden aufgrund von Sequenzhomologien die Komplementfaktoren C3, C4 und C5 sowie das komplement-fremde Protein α_2 -Makroglobulin gezählt [75]. Der wichtigste strukturelle Aspekt hierbei besteht in der Ausbildung einer intramolekularen Thioester-Bindung [75] (Ausnahme: C5), die die kovalente Bindung von C3b und C4b an andere Moleküle ermöglicht.

d) Proteine der gemeinsamen Endstrecke (terminal pathway)

Hierunter fallen die Komplementfaktoren C6 bis C9, die sich durch hohe Sequenzhomologien sowohl untereinander als auch zum LDL-Rezeptor, zu EGF und zu Thrombospondin (TSP) auszeichnen [76].

e) Regulatoren der Komplementaktivierung

Das gemeinsame Strukturelement dieser Gruppe von Proteinen ist das CCP-Motiv (complement control protein motif), das zuerst für Faktor B nachgewiesen wurde [77], darüberhinaus aber auch in CR1 (complement receptor 1, CD35), CR2 (complement receptor 2, CD21), DAF (decay-accelerating factor), MCP (membrane cofactor protein) und Faktor H vorgefunden wird.

1.3.3. "Pathways" des Komplementsystems

Das Komplementsystem lässt sich in vier Reaktionskaskaden einteilen, wobei man hierbei differenziert zwischen drei Aktivierungswegen, die zur Synthese der jeweiligen C3- und C5-Konvertase führen, und der gemeinsamen Endstrecke dieser drei Aktivierungswege als vierter Kaskade [72]. Die Bildung der C3- und C5-Konvertase kann durch Beschreiten des klassischen Aktivierungsweges (siehe 1.3.4.), des Lectin- [78] oder des alternativen Aktivierungsweges [76] erfolgen. Während der klassische Aktivierungsweg als Bindeglied zwischen unspezifischer und spezifischer Immunität aber antikörperabhängig aktiviert wird, sind beide anderen antikörperunabhängig.

Alle drei Aktivierungswege münden in eine gemeinsame Endstrecke (terminal pathway), die mit der Spaltung von C5 beginnt und durch die Anlagerung der verschiedenen Komponenten und dabei auftretenden Konformationsänderungen in der Bildung des MAC (membrane attack complex) resultiert [76].

1.3.4. Der klassische Aktivierungsweg

Der klassische Aktivierungsweg des Komplementsystems wird durch die Wechselwirkung des C1-Komplexes, einem Multimer der Stöchiometrie $C1q_2s_2$, mit den Fc-Regionen von Immunglobulinen (IgG, IgM) ausgelöst, wobei seine Aktivierung durch Polyanionen (bakterielle DNA, RNA), kleine Polysaccharide etc. jedoch auch beschrieben ist [79]. Durch die Bindung der globulären Domänen von C1q an Immunkomplexe werden eine Reihe von Konformationsänderungen und proteolytischen Schritten initiiert [80], angefangen mit der Dissoziation von C1-Komplex und C1-Inhibitor. Dies ermöglicht die Autoaktivierung des Zymogens C1r, welches dann das zweite Molekül C1r spaltet und so aktiviert. Daraufhin werden beide Moleküle C1s von C1r gespalten. Es sei darauf hingewiesen, dass an dieser Stelle der Reaktionskaskade C1-Inhibitor als *second stage*-Inhibitor fungieren kann, an die aktiven Zentren von C1r und C1s bindet und so ihre Inaktivierung und das Auflösen des Komplexes bedingt.

Aktiviertes C1s spaltet C4, sodass das Anaphylatoxin C4a und C4b entstehen. Innerhalb des C4b-Fragmentes wird in Folge dieses proteolytischen Schrittes eine hochreaktive Thioester-Bindung exponiert, die in wässrigem Milieu zwar sehr rasch hydrolysiert wird, aber doch von so langer Lebensdauer ist, dass in Gegenwart von Mikroorganismen oder Immunkomplexen durch Reaktion mit Hydroxyl- oder Aminogruppen kovalente Bindungen ausgebildet werden; es entstehen Cluster in der Nähe des ursprünglich aktivierten C1-Komplexes. So gebundenes C4b fungiert als Akzeptor für C2, das dann wiederum von C1s gespalten wird. Das Molekül C2b diffundiert ab, C2a mit seiner Serinprotease-Domäne verbleibt am C4b, mit C4b2a ist die C3-Konvertase des klassischen Aktivierungsweges entstanden. Diese Konvertase spaltet nun ihrerseits eine Bindung der α -Kette von C3, wobei das Anaphylatoxin C3a und das sehr labile Molekül C3b gebildet werden, über die Hydrolyse dessen hochreaktiver Thioesterbindung (vgl. C4b) die kovalente Bindung an die aktivierende Oberfläche möglich wird. Die so bedingte Lokalisation von C3b in der Nähe der C3-Konvertase resultiert in der Bildung der C5-Konvertase des klassischen Aktivierungsweges, C4b2a3b, die mit der Spaltung von C5 das erste Protein der gemeinsamen Endstrecke aktiviert (siehe 1.3.3.). Diese Reaktionskaskade besitzt insofern amplifizierenden Charakter, als ein gebundenes Molekül C1q die kovalente Bindung von 240 Molekülen C3b zur Folge hat [81].

Kontrolliert wird der klassische Aktivierungsweg von einer Reihe von Serumproteinen, die an verschiedenen Stellen der Reaktionskaskade regulativ wirken (C1-Komplex und C1-Inhibitor; C4b und C4b-Bindeprotein, Faktor I; C3b und Faktor H, Faktor I) bzw. von membranständigen, regulatorischen Proteinen (CR1, DAF, gp 45-70), die autogene Zelloberflächen vor der Bildung der C3-Konvertase schützen [79].

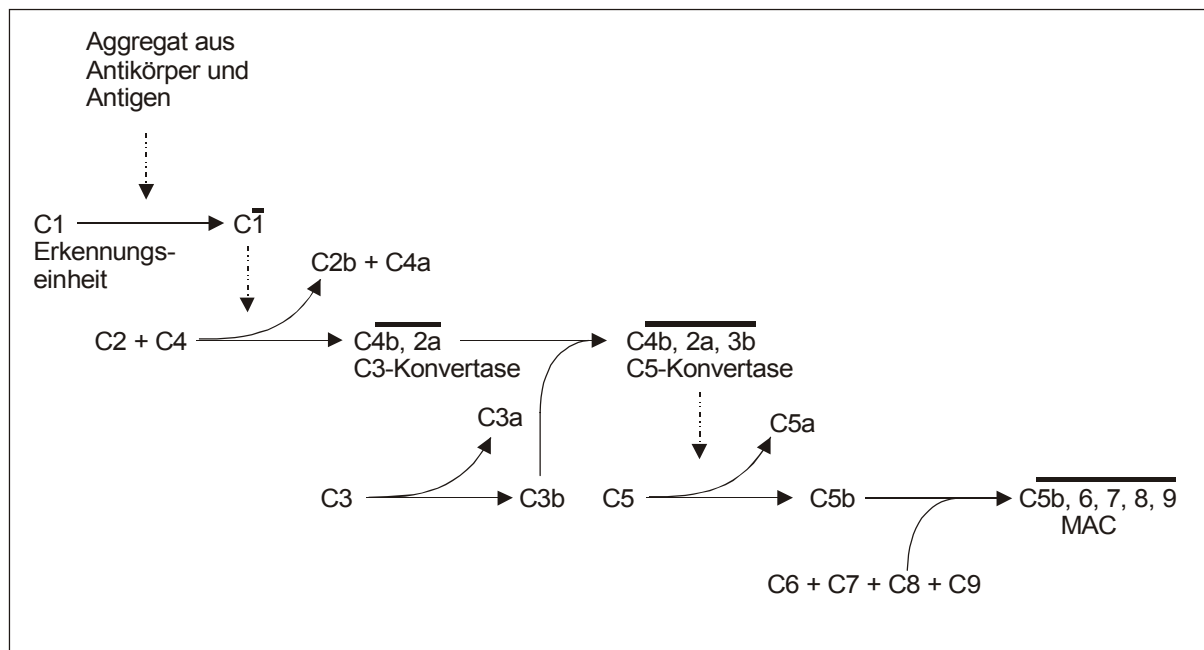


Abbildung 1.3: Klassischer Aktivierungsweg des Komplementsystems. Die unterbrochenen Pfeile weisen auf proteolytische Aktivierung hin, aktive Proteasen sind durch einen Querstrich über der Bezeichnung gekennzeichnet. Erklärung siehe Text. Nach [82].

1.3.5. Die Komplementfaktoren des klassischen Aktivierungsweges

Zu den Faktoren des klassischen Aktivierungsweges werden die Proteine C1q, C1s, C1r, C2 und C4 gezählt, deren Aktivierung zur Bildung der C3- und C5-Konvertase des klassischen Aktivierungsweges führt (vgl. Abschnitt 1.3.4.). Diese fünf Komplementfaktoren seien im Folgenden näher beschrieben.

a) Der Komplementfaktor C1q

Ein Molekül C1q ist aus den drei verschiedenen Aminosäureketten A (27,5kDa), B (25,2kDa) und C (23,8kDa) aufgebaut. Die einzelnen Untereinheiten setzen sich aus einem A-B-Heterodimer und einer C-Kette zu einer kollagen-ähnlichen Tripelhelix zusammen, wobei die Spitze einer Untereinheit von einer globulären Domäne gebildet wird. Ein Komplex aus sechs solchen Untereinheiten ist als funktionelles C1q zu betrachten [73]. Seine Ähnlichkeit mit Kollagen ergibt sich abgesehen davon auch aus dem relativ hohen Anteil von Hydroxylysin und Hydroxyprolin am Protein [83].

C1q bindet im Rahmen der Aktivierung des klassischen "pathways" an IgG- und IgM-haltige Immunkomplexe (siehe Abschnitt 1.3.4.).

1. Einleitung

Synthetisiert wird der Komplementfaktor C1q primär von Makrophagen [72], der Genort wurde mit 1p34-1p36.3 [84] bestimmt.

b) Der Komplementfaktor C1s

Bei dem Komplementfaktor C1s handelt es sich um ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 85kDa, das als Einzelstrang synthetisiert wird und Aktivierung durch Spaltung der Bindung R437-I438 erfährt, sodass aktives C1s aus den Ketten A und B, die über Disulfidbrücken verknüpft sind, besteht.

C1s ist eine hochspezifische Serinprotease, die nach Aktivierung durch C1r die Komplementfaktoren C2 (Spaltung einer Bindung zwischen Arginin und Lysin) und C4 (Spaltung einer Bindung zwischen Arginin und Alanin) aktiviert [85] (siehe Abschnitt 1.3.4.).

Primär exprimiert wird C1s in Hepatozyten, aber auch Monozyten, Epithel- und Endothelzellen sowie Zellen des zentralen Nervensystems [86] sind als Synthesorte beschrieben. Auffällig ist hierbei die koordinierte Expression mit C1r. Die Serumkonzentration von C1s beträgt 31µg/ml, das Gen ist auf Chromosom 12p13 [72] lokalisiert.

c) Der Komplementfaktor C1r

Bei dem Komplementfaktor C1r handelt es sich um ein Homodimer mit einem Molekulargewicht von 170kDa, wobei die Untereinheiten nicht kovalent aneinander gebunden sind. Aktivierung erfolgt durch Spaltung der Bindung R463-I464.

Der Faktor C1r ist wie C1s eine Serinprotease, die für die Aktivierung des C1-Komplexes verantwortlich ist (siehe Abschnitt 1.3.4.), wobei dieser Prozess die Autoaktivierung von C1r und die anschließende Spaltung von C1s umfasst.

C1r wird primär in Hepatozyten, aber auch in Monozyten, Epithel- und Endothelzellen und in Zellen des zentralen Nervensystems [86] exprimiert. Seine Serumkonzentration beträgt 34µg/ml. Der Genort für C1r wurde genau wie für C1s mit Chromosom 12p13 [72] bestimmt.

d) Der Komplementfaktor C2

C2 ist ein Glykoprotein (Molekulargewicht 81kDa), das monomer aufgebaut ist und in seiner Struktur dem Faktor B ähnelt. Der N-terminale Abschnitt wird hierbei vom Fragment C2b ausgemacht, das bei der Aktivierung durch C1s abgespalten wird, C2a fungiert im weiteren Verlauf des klassischen Aktivierungsweges als katalytische Untereinheit der C3- und C5-Konvertase.

Synthetisiert wird C2 in der Leber, aber auch Monozyten/Makrophagen [87], Fibroblasten [88] und Astrogliazellen [89] exprimieren dieses Protein. Seine Serumkonzentration beträgt 11-35µg/ml [90], das Gen liegt auf Chromosom 6p21.3 [91].

e) Der Komplementfaktor C4

C4 ist ein 200kDa-Protein aus drei über Disulfid-Brücken verknüpfte Untereinheiten (α , β , γ), das als Praepro-C4 synthetisiert wird, in dem die Untereinheiten des reifen Proteins in der Reihenfolge β - α - γ enthalten sind. Es existieren zwei Isoformen, C4A und C4B [91]. Genau wie C3 bildet C4 in der α -Kette eine intramolekulare Thioester-Bindung aus, über die nach der enzymatischen Abspaltung von C4a (9kDa) durch C1s die Bindung an die aktivierende Oberfläche erfolgt.

Expressionsorte von C4 sind vor allem die Leber [92], aber auch Monozyten/Makrophagen [87], die Lunge und die Niere [72]. Seine Serumkonzentration beträgt 450-750 μ g/ml [76], der Genort wurde mit 6p21.3 [93] bestimmt.

1.3.6. Fettgewebe und Komplementsystem

Mit den Komplementfaktoren C3, Faktor B und Adipsin (Faktor D) werden im Fettgewebe die drei essentiellen Komponenten des alternativen Aktivierungsweges [94] synthetisiert, wobei die Genexpression für den Komplementfaktor C3 und Faktor D während der Differenzierung ansteigt. Die gewebespezifische Aktivierung dieser Komponenten implizierte eine besondere Bedeutung für das Fettgewebe, die mit der Reinigung von ASP [95] bestätigt wurde. Das im Plasma meßbare ASP ist identisch mit C3adesArg, das im Fettgewebe aus C3 unter der Beteiligung von Faktor B und Adipsin entsteht und inzwischen als wirkungsvoller Stimulator von Glukose-Transport [96] und Triazylglyzerolsynthese [97] in Adipozyten beschrieben ist.

1.4. Aufgabenstellung

Als Grundlage dieser Arbeit diene die Annahme, dass die von der pharmakologischen Charakteristik des homomeren hP2X1-Rezeptors abweichende Agonistenpräferenz des Purinozeptors auf Stromazellen des humanen Fettgewebes entweder auf die Expression einer Splice-Variante (hP2X1a?) oder aber auf die Bildung von Heterooligomeren aus hP2X1 und einer anderen, eventuell noch unbekannten, Untereinheit zurückzuführen sei. Zur Lösung dieser Problematik sollte das Screening einer cDNA-Bank in einem Two-Hybrid-Assay beitragen. Dazu mußte zuerst ein geeigneter Abschnitt der hP2X1-cDNA als "Bait" in einen entsprechenden Vektor kloniert und dann eine cDNA-Bank aus Stromazellen des humanen Fettgewebes konstruiert werden, bevor diese einem Two-Hybrid-Screening unterzogen werden sollte.

In Erweiterung der eigentlichen Aufgabenstellung wurden während dieser Arbeit erlangte Indizien hinsichtlich der Expression von Komplementfaktoren des klassischen Aktivierungsweges in humanen Preadipozyten aufgegriffen und untersucht, welche der in Frage kommenden Komplementfaktoren nachzuweisen sind. Zur Analyse der differenzierungsabhängigen Expression dieser Faktoren sollte dabei eine semiquantitative RT-PCR etabliert werden.

2. Materialien und Methoden

2.1. Chemikalien

2.1.1. Allgemeine Chemikalien und Verbrauchsmaterial

In alphabetischer Reihenfolge der Hersteller:

Agfa-Gevaert	Entwickler (G150), Fixierer (G333c)
Amersham Life Science	ECL-Reagenz
ARK	Oligonukleotide
Biochrom	Penicillin G Natriumsalz, Streptomycin-Sulfat, M199, DMEM, Fötales Kälberserum (FKS), Trypsin (1:250 in PBS ohne Ca^{2+} , Mg^{2+}), Kollagenase (CLS)
Biomol	BSA
BTS-BioTech	FGF, human, basic
Boehringer Ingelheim	(+)-Biotin (cryst. red. grade), 3-Isobutyl-1-methylxanthin, Natriumdodecylsulfat
Boehringer Mannheim	Dig-markierter DNA-Molekulargewichtsstandard VI, VIII, CSPD, Blocking-Reagenz
CLONTECH	DNA aus Heringsspermien
De-Vau-De Gesund- kostwerk	Instant-Magermilchpulver (Frema Reform)
Difco	Bactotrypton, Hefeextrakt, Bactoagar
Fuji	Röntgenfilm Fuji Super RX 20x40 100 NIF
Gibco BRL	Agarose
Greiner	Kunststoffröhrchen
ICN Biomedicals	Guanidiniumthiocyanat, HEPES
MBI Fermentas	pBR322-AluI
Millipore	Spritzenfilter (Millex-GS), Filterglocken (Sterivex-GS)
Peqlab	dNTPs
SARSTEDT	Gewebekulturschalen, Zellkulturflaschen, Reaktionsgefäße, Petrischalen, Kunststoffküvetten, N,N'-Methylen-Bisacrylamid
Schleicher & Schuell	OPTITRAN BA-S 85 Reinforced Nitrocellulose 0,45µm
Serva	Biotin, NADH, N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin, Bromphenolblau, Ethidiumbromid, Ampicillin, MOPS,
Sigma-Aldrich	Acrylamid, apo-Transferrin (bovin, min 98%), D-Pantothenat,

2. Material und Methoden

	Cortisol, Insulin (aus Rinderpankreas), Ponceau S Natriumsalz, Dihydroxy-Acetonphosphat, Natriumdesoxycholat, Mineralöl, IPTG, 2-Mercaptoethanol, Triton X-100, Xylencyanol, Fast Red-Färbesubstrat, alle Komponenten des 10 x DO Supplement
USB	Tris
Whatman	Blottingpapier 3MM CHR

2.1.2. Puffer und Lösungen

Puffer Z1:	5mM K_2HPO_4 , 5mM KH_2PO_4 , 157mM NaCl, pH 7,4
Puffer Z2:	50mM Tris-HCl, pH 7,5, 1mM EDTA, 1mM Mercaptoethanol
GIT-Puffer:	47,3g Guanidiniumthiocyanat, (835 μ l 3M Natriumacetat, pH 6,0), ad 100 ml mit H_2O , nach Sterilfiltration Zusatz von 853 μ l Mercaptoethanol
CsCl-Lösung:	96g CsCl in 90ml 0,01M EDTA, pH 7,5 gelöst und Zusatz von 100 μ l DEPC. Nach Autoklavieren mit DEPC- H_2O ad 100ml
DEPC- H_2O :	1l H_2O bidest., 1ml DEPC nach heftigem Schütteln und 30min Inkubationszeit autoklaviert
TE-Puffer:	10mM Tris-HCl, pH 8,0, 1mM EDTA
10xTPE-Puffer:	216g Tris, 31ml 88% Phosphorsäure, 80ml (0,5M EDTA, pH 8,0) ad 2l
Phenol/Chloroform/	
Isoamylalkohol:	Flüssiges Phenol wurde solange mit TNE-Puffer (50mM Tris-HCl, pH 7,5, 150mM NaCl, 1mM EDTA) äquilibriert, bis sich pH 7,0 für die Phenol-Phase eingestellt hatte. Diese Phenol-Phase wurde anschließend mit dem gleichen Volumen einer 1:25-Verdünnung von Isoamylalkohol in Chloroform versetzt und bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.
20xSSC:	3M NaCl, 0,3M Natriumcitrat, pH 7,0
PBS:	8g NaCl, 0,2g KCl, 0,24g KH_2PO_4 , 1,44g Na_2HPO_4 ad 1l; pH 7,4
Z-Puffer:	16,1g $Na_2HPO_4 \times 7H_2O$, 5,5g $NaH_2PO_4 \times H_2O$, 0,75g KCl, 0,246g $MgSO_4 \times 7H_2O$ ad 1l, pH-Wert 7,0 und autoklaviert

Nicht aufgeführte Lösungen sind im Text angegeben.

2. Material und Methoden

2.1.3. Enzyme

Amersham	MMLV Reverse Transkriptase
Pharmacia	Restriktionsenzyme, Alkalische Phosphatase, T4 DNA Polymerase, T4 DNA Ligase
Roche	Taq DNA Polymerase

2.1.4. Antikörper

BABCO	Monoklonaler Antikörper HA.11
Boehringer Mannheim	Anti-digoxigenin-Antikörper, Fab-Fragmente, AP-konjugiert
Serotec	Anti-C1s-Antikörper aus Kaninchen, polyklonal Anti-C1r-Antikörper aus Kaninchen, polyklonal
Sigma Aldrich	Anti-Kaninchen-IgG(whole molecule)-Antikörper aus Ziege, polyklonal, Peroxidase-konjugiert Anti-Maus-IgG(whole molecule)-Antikörper aus Ziege, polyklonal, AP-konjugiert

2.1.5. Kits

CLONTECH	Two-Hybrid cDNA Library Construction-Kit (K1607-1)
Dianova	GeneClean II-Kit
Qiagen	RNeasy Mini Kit, Oligotex mRNA Mini Kit

2.2. Bakterienstämme, Hefestämme, Zellen, Vektoren und Oligonukleotide

2.2.1. Bakterienstämme und Bakterienmedien

E. coli DH5 α	supE44, Δ lacU169(Φ 80lacZ Δ M15)hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1
LB-Medium:	5g/l NaCl, 5g/l Hefeextrakt, 10g/l Bacto-Trypton, 15g/l Agar für Platten
LB _{amp} -Medium:	LB-Medium, 50 μ g/ml Ampicillin, 15g/l Agar für Platten
LB-Miller-Medium:	10g/l NaCl, 5g/l Hefeextrakt, 10g/l Bacto-Trypton

2. Material und Methoden

2.2.2. Hefestämme, Medien und Medienzusätze

CG-1945 **MATa**, ura3-52, his3-200, lys2-801, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4-542, gal80-538, cyh^r2, LYS2 : : GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3, URA3 : : Gal4_{17-mer(x3)}-CyC1_{TATA}-lacZ. Referenz [98]

Y190 **MATa**, ura3-52, his3-200, lys2-801, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4Δ, gal80Δ, cyh^r2, LYS2 : : GAL1_{UAS}-HIS3_{TATA}-HIS3, URA3 : : GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ. Referenz [99]

YPD-Medium: 20 g/l Difco Pepton, 10g/l Hefeextrakt, 20g/l Agar für Platten

SD-Medium: 6,7g Yeast Nitrogen base ohne Aminosäuren, 20g Agar für Platten, 850ml Wasser, 100ml 10 x DO Supplement. pH-Wert 5,8 einstellen und autoklavieren. Auf ca. 55°C abkühlen lassen, Zusatz von Glucose (Endkonzentration 2%) und Auffüllen auf 1l.

10 x DO Supplement: Enthielt alle folgenden Komponenten, bis auf diejenigen, durch deren Abwesenheit das Selektionsmedium definiert war:

Isoleucin (300mg/l), Valin (1,5g/l), Adenin (200mg/l), Arginin (200mg/l), Histidin (200mg/l), Leucin (1g/l), Lysin (300mg/l), Methionin (200mg/l), Phenylalanin (500mg/l), Threonin (2g/l), Tryptophan (200mg/l), Tyrosin (300mg/l), Uracil (200mg/l)

2. Material und Methoden

2.2.3. Zellen und Medien für die Zellkultur

Primäre humane Praeadipozyten:

Stromazellen des humanen Fettgewebes wurden aus Gewebeproben, die bei Reduktionsplastiken (Mamareduktionen, Abdominalplastiken, Gynäkomastien) in der Plastischen Chirurgie (Leitung: Dr. M. Eisenmann-Klein) des Krankenhauses St. Josef in Regensburg anfielen, isoliert.

Medium M199:	9,67g/l Trockenmedium M199 Earle, 100mg/l Streptomycin, 60mg/l Penicillin, 2,2g/l NaHCO ₃ , pH 7,2, 10% (v/v) FKS
Medium SD0:	12,78g Trockenmedium (DMEM+HAM's F-12 (3:1)), Streptomycin (100mg/l), Penicillin (60mg/l), NaHCO ₃ (2,45g/l), Pantothentat (4,05mg/l), Transferrin (2mg/l), Biotin (1µM), pH 7,2
Medium SD6:	Medium SD0, 1µM Insulin
Medium SD9:	Medium SD0, 1nM Insulin
Aufzuchtmedium:	Medium SD6, bFGF (1ng/ml), Cortisol (5x10 ⁻⁸ M)

2.2.4. Vektoren und Oligonukleotide

Vektor	Marker	Referenz
pUC18	<i>amp^r, lacZ, lacI</i>	[100]
pAS1	<i>ampr, TRP1</i>	[101]
pGAD10	<i>amp^r, LEU2</i>	[102]
pUC18-P2X1/800	<i>amp^r, lacZ, lacI</i> , P2X1-cDNA (AS K190-S399)	diese Arbeit
pAS1-FEL	<i>ampr, TRP1</i> , P2X1-cDNA (AS K190-I331)	diese Arbeit
pGAD10-cDNAs, 1 und 2	<i>ampr, LEU2</i> , cDNAs aus Stromazellen des humanen Fettgewebes	diese Arbeit

2. Material und Methoden

Oligonukleotid	Sequenz 5' → 3'
P2X1for1	CCG AAT TCA ARA ACA GCA TCA GC mit R = G oder A
P2X1for2	CTG AAT TCA GTT CTG AGC CCT GCC
P2X1rev2	CTG TCG ACA AAC TGC TCT CTG CCT GG
P2X1EL1	CGG GAT CCG GAA GAA CAG CAT CAG C
P2X1EL2	GCG TCG ACT TGT AGG GAT GAT GTC
P2X1newa	ATG GCA CGG CGG TTC CAG
P2X1reva	GGT ACA GCC ACT GTC TTC C
P2X1revb	TCT TGT GAA AGA GGC AGG TC
P2X1revc	GGG ATG ATG TCA AAC TTC CC
univ	GTA AAA CGA CGG CCA GT
rev	TCA CAC AGG AAA CAG CTA TGA C
ON2H3	AGA TGC CGT CAC AGA TAG
GAL4 AD seq	TAC CAC TAC AAT GGA TG
5' AD LD-ISP	CTA TTC GAT GAT GAA GAT ACC CCA CCA AAC C
3' AD LD-ISP	GTG AAC TTG CGG GGT TTT TCA GTA TCT ACG A
C1qfor	AGG GAT AAA AGG AGA GAA AG
C1qrev	TAG GCA TAG TCA CAG AAG GT
C1sfor	CTG GAC ATT GAG CTG TCA GA
C1srev	TCA GTG CAG TGA ATA CAT CC
C1rfor	ATG ACC ACC AGC AAG TAC AC
C1rrev	TGC CAT CAT CCT GGC AGA CA
C2for	TATGACTGAGGTGATCAGCA
C2rev	GGA CCC TAG CTC ATT CAG TT
C4for	CGG GTC TTT GCT CTG GAT CA
C4rev	CTT CAC CTC AAA GTT GGG AA
ribofor	GGACACGGACAGGATTGACAGAT
riborev	CTTGTCCCTCTAAGAAGTTGGGG
pTSAR2	TTG TCG ACT ₁₈ R mit R = A, G oder C

2. Material und Methoden

2.3. Geräte

In alphabetischer Reihenfolge der Hersteller:

Bachhofer	Hybridisierschränke
Biorad	Gene-Pulser™
Branson	Ultraschall-Desintegrator (Sonifier 250) mit konischer Mikrospritze
Braun	Horizontalschüttler (Certomat R), Inkubations- haube (Certomat H)
Canberra-Packard	Szintillationszähler (1600TR)
Fröbel Labortechnik	Spannungsquelle (Consort E443), Video- Densitometer (Bio-Profile 930204), UV- Tischlampe (TFX-20M)
Heraeus	Tischzentrifugen (Biofuge A, Biofuge 15, Biofuge fresco, Biofuge Primo), Begasungs- brutschrank (B5060 Ek-CO ₂)
Hirschmann Laborgeräte	Pipettierhilfe (Pipetus-akku)
Hölzel	Geltrockner (Drystar)
Jouan	Tischzentrifugen (CT422, C412)
Kontron	Spektrophotometer (Uvikon 930), Kühl- zentrifuge (Centrikon T-324), Ultrazentrifuge (Centrikon T-1170)
LKB Bromma	Elektrophoreseapparatur (2050 MIDGET)
Melag	Bakterienbrutschrank (Incubat 85)
Olympus	Mikroskop (IMT-2)
Perkin Elmer	DNA-Thermal Cycler 480
Pharmacia	Spannungsquellen (GPS 200/400, EPS 500/ 400, ECPS 3000/150), Gelelektrophorese- apparaturen (GNA-100, GNA-200), Spektro- photometer (Biochrom 4060)
Privileg	Mikrowellengerät
Tecan	Easy Reader EAR 340 AT
Techne	Thermoblock (Dri-Block 2P)
Vilber Lourmat	UV-Tischlampe (Fluo-Link), Software für Video-Densitometer (BIO1D)

2.4. Zellkultur

Zellkulturtätigkeiten wurden unter sterilen Bedingungen ausgeführt. Medien und Medienzusätze waren vor Gebrauch durch 0,22 µm Sterilfilter filtriert, Glasgeräte und Pipetten sowie Präparierbestecke waren autoklaviert oder sterilisiert. Alle Medien und Waschlösungen waren auf 37 °C vortemperiert. Die Zellen wurden in einem Begasungsbrutschrank bei 37 °C und in einer wassergesättigten Atmosphäre aus 5% CO₂ und 95% Luft kultiviert.

2.4.1. Isolierung von Stromazellen des humanen Fettgewebes

Stromazellpräparationen aus den subcutanen Fettdepots der Brust und des Bauches wurden in Abwandlung der Methode von Wiederer bzw. Björntorp [102, 104] gewonnen:

Entsprechendes Gewebe wurde in 0,9%ige Natriumchlorid-Lösung überführt. Zerkleinerte Gewebeteile wurden von Bindegewebe und sichtbaren Blutgefäßen befreit und anschließend in Kollagenase-Lösung (Kollagenase (1mg/ml) und Rinderserumalbumin (15mg/ml) in 100mM HEPES, pH 7,4, 120mM NaCl, 50mM KCl, 1mM CaCl₂, 5mM Glukose) überführt (1g Gewebe/ml Lösung). Die Gewebestückchen wurden weiter zerkleinert, bevor sie 30 Minuten in einem auf 37 °C vorgeheizten Schüttelwasserbad verdaut wurden. Die so erhaltene Zellsuspension wurde mit M199 verdünnt, durch einen Nylonfilter (Maschenweite 250µm) filtriert und ca. 15 Minuten stehen gelassen, bis die Adipozyten obenauf schwammen und abgenommen werden konnten. Es schloss sich ein weiterer Filtrationsschritt durch einen Nylonfilter (Maschenweite 30µm) an. Das Filtrat wurde erneut mit M199 verdünnt und dann zentrifugiert (7min bei 700g und 37°C). Das Zellpellet wurde in M199 resuspendiert und gemäß 2.4.2. weiterbehandelt.

Wurden reife Adipozyten benötigt, so wurden die abgenommenen Adipozyten dreimal mit dem doppelten Volumen 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung gewaschen und dann weiterverarbeitet.

2.4.2. Kultivierung und Subkultivierung von Stromazellen des humanen Fettgewebes

Die gemäß 2.4.1. erhaltene Stromazellsuspension wurde mit M199 so verdünnt und anschließend ausgesät, dass sich die Stromazellen aus 200mg verdautem Fettgewebe auf 1cm² Zellkulturfläche wiederfanden. Nach 16-18h wurden die Zellen intensiv mit M199 gewaschen (Entfernung nicht-adhärenter Zellen) und dann im Begasungsbrutschrank mit Medienwechsel an jedem 2. Tag weiterinkubiert bis Konfluenz erreicht war, sodass entweder auf serumfreie Bedingungen umgestellt werden konnte (siehe 2.4.3.) oder die Zellen subkultiviert werden konnten. Dazu wurde das Medium vollständig aus den Kulturgefäßen

2. Material und Methoden

entfernt und die Zellen mit 0,25%iger Trypsin-Lösung überschichtet (2ml Trypsin-Lösung/25cm² Kulturfläche) und anschließend ca. 30min bei 37°C inkubiert, bis sich schließlich durch hartes Schlagen gegen den Boden des Kulturgefäßes die Zellen fast quantitativ von der Kulturfläche ablösen ließen. Nach entsprechender Verdünnung mit M199 konnten die Zellen mit der gewünschten Aussaatdichte in die neuen Zellkulturschalen überführt werden.

2.4.3. Umstellen auf serumfreie Bedingungen

Wenn die primärkultivierten Stromazellen Konfluenz erreicht hatten, wurde das Medium M199 vollständig entfernt und die Zellen mit serumfreien Medium SD9 mehrmals gewaschen (Tag 0), bevor sie für 24h in SD9 weiterinkubiert wurden. Nach Medienwechsel am Tag 1 konnten die Stromazellen weitere 24h später (Tag 2) in den Experimenten unter serumfreien Bedingungen eingesetzt werden.

2.4.4. Serumfreie Aufzucht und Differenzierung primärkultivierter humaner Praeadipozyten

Nach Isolierung der Stromazellen und Aussaat in M199 (Tag X) wurden die Zellen 16-18h später intensiv mit M199 gewaschen und weitere 24h in M199 inkubiert. Umstellung auf serumfreie Bedingungen erfolgte am Tag X+2. Dazu wurden die Zellpräparationen mit SD6 gewaschen und daraufhin in Aufzuchtmedium mit Medienwechseln an jedem 2. Tag bis zur Konfluenz weiterinkubiert. Ab Differenzierungsstartpunkt (Tag 0) enthielt das verabreichte Medium SD6 zusätzlich IBMX (0,5 mM) und Cortisol (10^{-7} M). Diese Differenzierungszusätze entfielen mit dem Medienwechsel am Tag 8, die Zellen wurden in SD6 weiterinkubiert. Die Häufigkeit der Medienwechsel während der Differenzierung ist bei den jeweiligen Experimenten vermerkt.

2.5. Charakterisierung der Zellen

2.5.1. Zellernte für die Bestimmung der Gesamtproteinmenge und der spezifischen GPDH-Aktivität

Die Zellernte erfolgte nach Entfernen des Zellkulturmediums und einmaligem Waschen der Zellen mit Z1-Puffer durch Überschichten der Zellen mit Z2-Puffer. Die Zellen wurden mittels eines Zellschabers von der Kulturfläche abgelöst, die so erhaltene Zellsuspension wurde in

2. Material und Methoden

ein 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach Lyse der Zellen durch Ultraschall-Behandlung (Branson-Sonifier, 6 Stöße à 50% Duty Cycle bei 20% Output Control) und Zentrifugation der Lysate (5min bei 13000rpm und 4°C) konnten diese zur Bestimmung der GPDH-Aktivität herangezogen werden. Bis zur Bestimmung der Gesamtproteinmenge wurden die Lysate bei -20°C aufbewahrt.

2.5.2. Bestimmung der Gesamtproteinmenge nach Bradford

Proteinbestimmungen wurden nach der Methode von Bradford [105] durchgeführt. Ausgehend von einer Farbstoff-Stammlösung (0,3g Serva Blue G-250, gelöst in einer Mischung aus 60ml 88%iger Phosphorsäure und 30ml Ethanol) wurde die Arbeitslösung durch Mischen von 10ml Stammlösung, 26,7ml 88%iger Phosphorsäure, 13,3ml Ethanol und 150ml Wasser erhalten. Nach Filtration durch ein Faltenfilter wurde diese Arbeitslösung im Dunkeln aufbewahrt.

Zu testende Proben oder aus ihnen gewonnene Verdünnungen (100µl) wurden auf Mikrotiterplatten mit Arbeitslösung (200µl) versetzt und unmittelbar darauf bei 620nm im Mikrotiterplatten-Spektrophotometer vermessen. Die Proteinbestimmung erfolgte durch Vergleich mit einer auf derselben Mikrotiterplatte angesetzten Rinderserumalbumin-Eichkurve (Konzentrationsbereich 0-40µg/ml).

2.5.3. Bestimmung der spezifischen GPDH-Aktivität

Die Bestimmung der Glycerinphosphat-Dehydrogenase-Aktivität erfolgte über einen modifizierten optischen Test nach Pairault und Green [106]. Nacheinander wurden hierfür in eine Plastikküvette (Schichtdicke 1cm) pipettiert: 660µl Wasser, (200-X)µl Z2-Puffer, Xµl Zellysat, 100 µl TRAM-Puffer (1M Triethanolamin/HCl_{konz.}, pH 7,5, 25mM EDTA), 20µl Mercaptoethanol (5mM) und 10µl NADH (12mM). Nach Reaktionsstart durch Zugabe von 10µl Dihydroxyacetonphosphat (20mM) und Durchmischen des Ansatzes wurde die Reaktion über einen Zeitraum von 4,2min bei 340nm photometrisch verfolgt. Aus der Extinktionsabnahme je Zeiteinheit ergibt sich die GPDH-Aktivität mit $\varepsilon = 6,2 \text{ ml}/(\mu\text{mol}\cdot\text{cm})$. Per definitionem entspreche 1U der Oxidation von 1µmol NADH je Minute. Die spezifische GPDH-Aktivität ergibt sich unter Berücksichtigung der entsprechenden Gesamtproteinmenge.

2.5.4. Bestimmung der Aromatase-Aktivität

Der Test zur Bestimmung der Aromatase-Aktivität stellte eine modifizierte Form [11] eines Testsystems dar [12], das auf der Freisetzung von stöchiometrischen Mengen an $^3\text{H}_2\text{O}$ bei der von der Aromatase katalysierten Bildung von Estradiol aus $1\beta,2\beta\text{-}^3\text{H}$ -Testosteron beruht. $^3\text{H}_2\text{O}$ als nicht-steroidales Nebenprodukt der Aromatase-Reaktion konnte mit geringem Aufwand isoliert und quantifiziert werden.

18h nach Induktion der Aromatase-Aktivität wurde $1\beta,2\beta\text{-}^3\text{H}$ -Testosteron als Aromatase-Substrat zum Zellkulturüberstand pipettiert ($1\mu\text{Ci/Well}$, 50nM Endkonzentration für subkultivierte Zellen) und die Zellen anschließend weitere 6h Stunden inkubiert. Das Zellkulturmedium ($500\mu\text{l}$) wurde daraufhin von den Zellen entfernt und zu $1000\mu\text{l}$ eiskalter 30% Trichloressigsäure pipettiert. Die Proben wurden durchmischt, 10min stehen gelassen und nach Zentrifugation (5min bei $17000g$) wurden $1000\mu\text{l}$ des Überstandes zu 4ml Chloroform in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und 15s stark geschüttelt. Nach Phasetrennung wurden $700\mu\text{l}$ der wässrigen Phase abgenommen, zu $700\mu\text{l}$ Dextran-beschichteter Aktivkohle-Suspension (0,5% Dextran, 5% Aktivkohle) gegeben, stark geschüttelt und zentrifugiert (15min bei $17000g$). $700\mu\text{l}$ des so erhaltenen Überstandes wurden zu 4ml Szintillations-Cocktail in Mini-Vials pipettiert, durchmischt und anschließend mindestens 30min im Dunklen inkubiert, bevor die Proben im Szintillationszähler mit automatischer Quenchkorrektur (bezogen auf eine entsprechende Quenchkurve) ausgezählt wurden. Die so bestimmten Aktivitäten wurden unter Berücksichtigung entsprechender Verdünnungsfaktoren, der spezifischen Aktivität des verwendeten $1\beta,2\beta\text{-}^3\text{H}$ -Testosterons und eines stereochemischen Korrekturfaktors [130] in Aromatase-Aktivitäten umgerechnet.

2.6. Molekularbiologische Methoden

2.6.1. Isolierung von Nukleinsäuren

2.6.1.1. Isolierung von Gesamt-RNA aus Stromazellen des humanen Fettgewebes

Gesamt-RNA aus Stromazellen des humanen Fettgewebes wurde in größerem Maßstab durch CsCl-Gradientenzentrifugation isoliert [107]. Nachdem das Zellkulturmedium von den zu erntenden Zellen entfernt worden war, wurden diese mit Z1-Puffer gewaschen, bevor die Zell-Monolayer in GIT-Puffer geerntet und homogenisiert wurden. Dieses GIT-Zellysat (7ml) wurde vorsichtig auf in UZ-Röhrchen vorgelegte CsCl-Lösung (4ml) pipettiert. Nach Zentrifugation (22-24h bei 28000rpm und 20°C) wurde der Überstand abgenommen, das RNA-

2. Material und Methoden

Pellet mit eiskaltem 70%igen Ethanol gewaschen, getrocknet und in dem gewünschten Volumen an DEPC-H₂O resuspendiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte durch Messung der Absorption bei 260 nm.

GIT-Zellysate wurden, sofern sie nicht sofort der Ultrazentrifugation unterzogen wurden, bei –20°C aufbewahrt. RNA wurde im gefällten Zustand (0,1 VT 3M Natriumacetat, pH 5,2, 2 VT Ethanol) bei –80°C aufbewahrt.

2.6.1.2. Reinigung von polyA⁺-RNA

polyA⁺-RNA aus Stromazellen des humanen Fettgewebes wurde ausgehend von Gesamt-RNA mit dem Oligotex mRNA-Kit (Qiagen) unter Berücksichtigung der Angaben des Herstellers isoliert. Nach Elution der polyA⁺-RNA vom Säulenmaterial wurde diese über Nacht bei –80°C gefällt (0,1 VT 3M Natriumacetat, pH 5,2, 2 VT Ethanol) und nach Resuspendieren in DEPC-H₂O quantifiziert. Obligatorisch war die Analyse der Qualität der mRNA-Präparation durch Elektrophorese in denaturierenden Formaldehyd-Gelen.

2.6.1.3. Isolierung von Plasmid-DNA aus E. coli

Zur Gewinnung von Plasmid-DNA aus E. coli für Restriktionsanalysen, Sequenzierungen, usw. wurden 4ml einer Übernachtskultur abzentrifugiert (5min bei 13000 rpm und 4°C). Das Bakterienpellet wurde in 300µl Puffer 1 (50mM Tris-HCl, pH 8, 10mM EDTA, 100µg/ml RNaseA) resuspendiert, anschließend wurden 300µl Puffer 2 (200mM NaOH, 1% SDS) zugegeben, vorsichtig gemischt und 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 300µl Puffer 3 (3M Kaliumacetat, pH 5,5) wurde erneut vorsichtig gemischt, die Probe 5min auf Eis stehen gelassen und zentrifugiert (5min bei 13000rpm und 4°C). Der so erhaltene Überstand wurde erneut zentrifugiert (5min bei 13000rpm und 4°C) und daraufhin mit 1ml eiskaltem Ethanol versetzt. Diese Mischung wurde mind. 30min bei –20°C inkubiert, bevor die Plasmid-DNA abzentrifugiert werden konnte (15min bei 13000rpm und 4°C). Das Pellet wurde mit eiskaltem 70% Ethanol gewaschen, in TE-Puffer resuspendiert und durch Messung der Extinktion bei 260nm quantifiziert.

2.6.1.4. Isolierung von Plasmid-DNA aus Hefen

Plasmid-DNA aus Hefen wurde unter Verwendung von Glasperlen und durch Phenol/Chloroform-Extraktion isoliert [108, modifiziert]:

2-3 Kolonien (Ø ca. 2mm, nicht älter als 4 Tage) des entsprechenden Klons wurden mit Hilfe einer Oese in 1ml TE-Puffer in einem 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt und 30s gevortext.

2. Material und Methoden

Nach Zentrifugation (1min bei 14000rpm und Raumtemperatur) wurde das Pellet in 30µl Suspensions-Puffer (10mM Tris-HCl, pH 8, 1mM EDTA, 4,5 u/µl Lyticase; sterilfiltriert) resuspendiert und 30min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 170µl Lyse-Puffer (10mM Tris-HCl, pH 8, 100mM NaCl, 1mM EDTA, 1% SDS, 2% (v/v) Triton X-100) wurde die Suspension in ein 1,5ml-Reaktionsgefäß mit 200µl Glasperlen (\varnothing 0,45-0,5mm) überführt, 200µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Mischung zupipettiert und 10min bei höchster Stufe gevortext. Nach Zentrifugation (10min bei 14000rpm und Raumtemperatur) und Phasentrennung wurde die wässrige Phase in ein neues 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt, 8µl 10M Ammoniumacetat-Lösung und 500µl 95% Ethanol zupipettiert und die DNA bei –80°C für mind. 1h gefällt. Nach Zentrifugation (10min bei 14000rpm und Raumtemperatur) wurde das so erhaltene Pellet in 20µl H₂O resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei –20°C aufbewahrt.

2.6.1.5. Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA

Zur Analyse der Qualität von RNA-Präparationen und für Northern-Blots wurde die RNA durch Elektrophorese in 1%igen denaturierenden Formaldehyd-Gelen aufgetrennt [107]. Die entsprechenden Gele wurden durch Lösen von 0,2g Agarose in einer Mischung aus 4ml 5xMOPS-Lösung (0,2M MOPS, 0,05M Natriumacetat, 1mM EDTA, pH 7; autoklaviert) und 12,4ml DEPC-H₂O in der Hitze erhalten. Nach Zusatz von 3,57ml Formaldehyd und Ethidiumbromid (0,5µg/ml Endkonzentration) konnten die Gele in die entsprechende Form gebracht werden. Der Zusatz von Ethidiumbromid entfiel immer dann, wenn Northern-Blotting beabsichtigt war.

Die zu analysierenden RNA-Proben wurden mit dem doppelten Volumen RNA-Proben-Puffer (Mischung aus 10ml Formamid, 3,5ml Formaldehyd und 2ml 5xMOPS-Lösung; Aliquots bei –20°C aufbewahrt) versetzt und 5min bei 65°C denaturiert. Nach dem Abkühlen auf Eis und Zusatz von 2µl RNA-Lade-Puffer (50% (w/v) Glycerin, 1mM EDTA, 0,4% Bromphenolblau; Aliquots bei –20°C) wurden die Proben auf das vorelektrophoretisierte Gel (10min, 5V/cm) aufgetragen, als Laufpuffer wurde 1xMOPS-Lösung verwendet.

2.6.1.6. Gelelektrophoretische Reinigung von DNA

DNA-Fragmente und PCR-Produkte wurden durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Agarosegele wurden durch Lösen der erforderlichen Menge Agarose in 1xTPE-Puffer und anschließender Zugabe von Ethidiumbromid (0,5µg/ml Endkonzentration) hergestellt. Die Proben wurden, wenn notwendig, durch Zugabe von Wasser auf ein Volumen von 15 µl gebracht, mit 2µl Proben-Puffer (0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol, 40% (w/v)

2. Material und Methoden

Glycerin) versetzt und aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer Stromstärke von 80mA durchgeführt, nach dem Lauf wurde das UV-Flourogramm des Agarosegels mit Hilfe eines Video-Densitometers ausgewertet.

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus präparativen Gelen erfolgte durch Ausschneiden der entsprechenden Bande aus dem ethidiumbromid-gefärbten Gel und folgender Elution der DNA mit dem Geneclean II-Kit unter Berücksichtigung der Angaben des Herstellers.

2.6.2. Enzym-katalysierte Modifizierungen von DNA

2.6.2.1. Vedau von DNA mit Restriktionsenzymen

Zur Klonierung von PCR-Produkten über kohäsive Enden oder zur Restriktionsanalyse von Plasmid-DNA wurden diese mit Restriktionsenzymen verdaut. Enzymmenge, Pufferzusammensetzung und Reaktionszeit richteten sich nach den Angaben des Herstellers. Verdauansätze zur Restriktionsanalyse wurden unmittelbar nach Inkubation mit Proben-Puffer versetzt und der Agarose-Gelelektrophorese unterzogen.

2.6.2.2. Behandlung von DNA-Enden mit Klenow-Polymerase

Zum Auffüllen rezessiver 3'-Termini wurden ca. 300-500ng DNA mit 2U Klenow-Polymerase in 10mM Tris-HCl, pH 8,0, 60mM NaCl, 6,6mM MgCl₂, 2mM DTT in Gegenwart von 0,2mM dNTP behandelt (45min bei 37°C).

2.6.2.3. Behandlung von DNA-Enden mit T4 DNA Polymerase

Ca. 300-500ng DNA wurden in T4 DNA Polymerase-Puffer (67mM Tris-HCl, pH 8,8, 16,6mM Ammoniumsulfat, 10mM Mercaptoethanol, 6,7mM MgCl₂, 6,7mM EDTA, 0,16mg Rinder-serumalbumin) in Gegenwart von 0,1mM dNTP mit 2U T4 DNA Polymerase behandelt (15min bei 12 °C). Das DNA-Fragment wurde anschließend mit dem Geneclean II-Kit aus der Lösung isoliert und weiterverarbeitet.

2.6.3. Klonierung von DNA

2.6.3.1. Präparation von Vektoren

Standardmäßig wurden 2µg Vektor-DNA im 20µl-Ansatz mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut. Die eingesetzten Mengen der jeweiligen Restriktionsenzyme richteten sich nach den Angaben der Hersteller. Der Erfolg des Verdau wurde durch analytische Agarose-Gelelektrophorese bestätigt, bevor die Vektor-DNA zur Unterbindung von Religation mit Alkalischer Phosphatase behandelt wurde (100µl-Ansatz mit 1U Alkalischer Phosphatase; 1h bei 37°C). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2µl 0,5M EDTA, pH 8 abgestoppt und die linearisierte, dephosphorylierte Vektor-DNA mit dem GeneClean II-Kit aus der Lösung zurückgewonnen.

2.6.3.2. Klonierung von PCR-Fragmenten

2.6.3.2.1. Klonierung über kohäsive Enden

Über die in der PCR verwendeten Oligonukleotid-Primer wurden entsprechende Restriktionschnittstellen für die Klonierung in den Vektor eingeführt. Nach Verdau und Gelelektrophorese wurde das zu klonierende Fragment mit dem GeneClean II – Kit aus dem Agarosegel isoliert und konnte in die Ligation eingesetzt werden.

2.6.3.2.2. Klonierung über bündige Enden

Nach der Isolierung des PCR-Produktes aus dem Agarosegel und Behandlung der DNA-Enden mit T₄-DNA-Polymerase wurde das Fragment zur Phosphorylierung der 5'-Enden mit 1U T₄-Polynukleotidkinase in OPA⁺-Puffer in Gegenwart von 1mM ATP behandelt. Nach Hitze-Inaktivierung des Enzymes (10min bei 65°C) konnte das so behandelte DNA-Fragment in die Ligation eingesetzt werden.

2.6.3.3. Ligation

Vor jeder Ligation erfolgte eine Mengenabschätzung für Vektor-DNA und Insert-DNA über die Intensität der entsprechenden Bande in einem ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel. Bei der Ligation von kohäsiven Enden erfolgte diese mit äquimolaren Mengen an Vektor- und Insert-DNA, während bei der Ligation von bündigen Enden die Insert-DNA in ca. 2fachem Überschuss eingesetzt wurde. Standardmäßig wurden ca. 100ng an Vektor-DNA in die

2. Material und Methoden

Ligation eingesetzt, die mit 6U T4 DNA Ligase im entsprechenden Puffersystem bei 16°C über Nacht durchgeführt wurde. Ligationsansätze wurden vor der Transformation in der Regel nicht weiter aufgereinigt.

2.6.3.4. Transformation von *E. coli*

2.6.3.4.1. Hitzeschock-Transformation von *E. coli* [109, modifiziert]

50ml SOB-Medium wurden mit einer Vorkultur entsprechend einer Dichte von $OD_{600} = 0,05$ angeimpft und solange unter Schütteln (180rpm) bei 37°C inkubiert, bis die Bakterienkultur eine Dichte von $OD_{600} = 0,5$ erreicht hatte. Nach Zentrifugation (10min bei 3000rpm und 4°C) wurde das Bakterienpellet in 15ml TfbI (30mM Kaliumacetat, 50 mM $MnCl_2$, 100mM KCl, 15% (w/v) Glycerin, pH 5,8) resuspendiert und 10min auf Eis gestellt. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet unter Schwenken in Eiswasser vorsichtig in 2 ml TfbII (10mM MOPS, pH 7,0, 75mM $CaCl_2$, 10mM KCl, 15% (w/v) Glycerin) aufgenommen, in 1,5ml-Reaktionsgefäße verteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die so erhaltenen chemisch-kompetenten Zellen wurden bei -80°C aufbewahrt.

Für die Transformation wurden 50µl der auf Eis aufgetauten Bakteriensuspension und max. 10µl eines Ligationsansatzes vermischt. Nach 30min auf Eis und einem Hitzeschritt (90s bei 37°C) wurde der Transformationsansatz 2min auf Eis gestellt, anschließend mit 500µl SOC-Medium versetzt und 45min bei Raumtemperatur stehengelassen. In der Regel wurden zwei Aliquots (50, 150µl) ausplattiert.

2.6.3.4.2. Transformation von *E. coli* durch Elektroporation

Elektrokompetente *E. coli* wurden nach der Vorschrift in [102] hergestellt. *E. coli* DH5α wurden auf LB-Agar ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Mit einer Kolonie wurden 25ml LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt (180rpm). 5ml dieser Übernachtskultur wurden zu 500ml LB-Miller-Medium gegeben und bis zu einer Dichte von $OD_{600} = 0,6$ geschüttelt (180rpm). Anschließend wurde 1h auf Eis inkubiert, bevor die Bakterien in sterilen Zentrifugenbechern sedimentiert wurden (15min bei 2800g und 4°C; genauso alle folgenden Zentrifugationen). Die Pellets wurden vorsichtig in insgesamt 500ml eiskalter 10% (w/v) Glycerin-Lösung resuspendiert. Nach Zentrifugation und Resuspendieren der Bakterien in 250ml 10% (w/v) Glycerin-Lösung, erneuter Zentrifugation und Resuspendieren in insgesamt 125ml 10% (w/v) Glycerin-Lösung wurde ein letztes Mal zentrifugiert. Die Pellets wurden mit Glycerin auf ein Endvolumen von 1,8ml gebracht und in 100µl-Aliquots

2.6.5. Two-Hybrid-Screening

2.6.5.1. Transformation von Hefen

1ml YPD-Medium wurde mit mehreren Kolonien des zu transformierenden Hefestammes angeimpft und heftig geschüttelt, bevor die Zellen in 150ml YPD-Medium überführt und über Nacht (ca. 15h) bei 30°C bis zu einer Dichte von $OD_{600} > 1,5$ geschüttelt wurden (200rpm). 1l YPD-Medium wurde mit dieser Übernacht-Kultur versetzt, bis eine Dichte von $OD_{600} = 0,2$ erreicht war, anschließend wurde 3h bei 30°C geschüttelt (200rpm). Nachdem eine Dichte von $OD_{600} = 0,5$ erreicht war, wurde abzentrifugiert (5min bei 1000xg und Raumtemperatur) und die Pellets in insgesamt 500 ml sterilem Wasser resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Pellets in insgesamt 8ml TE/LiAc-Lösung (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 100mM Lithiumacetat, pH 7,5) resuspendiert. Diese kompetenten Hefen wurden zu der vorbereiteten Plasmid-Lösung (Gemisch aus pAS1-FEL und pGAD10-cDNAs im Verhältnis 2:1), die mit Träger-DNA aus Heringsspermien versetzt war, gegeben, heftig geschüttelt und mit 60ml PEG/LiAc-Lösung (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, 100mM Lithiumacetat, pH 7,5, 40% Polyethylenglykol PEG 4000) versetzt. Nach 30min Schütteln (200rpm) bei 30°C wurde mit 7ml DMSO versetzt, 15min unter gelegentlichem Schütteln bei 42°C inkubiert und 2min auf Eis abgekühlt, bevor die Zellen abzentrifugiert wurden (5min bei 1000xg und Raum-temperatur) und das Pellet in TE-Puffer resuspendiert wurde.

2.6.5.2. Screening

Die transformierten Hefen wurden auf SD/-Trp/-Leu/-His/+3-AT-Platten ausplattiert und mehrere Tage bei 30°C inkubiert, bis Kolonien sichtbar wurden.

2.6.5.3. Galaktosidase-Assay

Klone, die ohne Histidin hochgewachsen sind, wurden in einem β -Galaktosidase-Test auf die Expression des *lacZ*-Reportergens untersucht. Dazu wurden in Frage kommende Klone erneut auf SD/-Trp/-Leu/-His-Platten ausgestrichen und mehrere Tage bei 30°C inkubiert, bis die Kolonien Durchmesser von 2-3mm erreicht hatten. Durch Auflegen einer Filtermembran wurde ein Abklatsch der zu testenden Kolonien erzeugt, der nach dem vorsichtigen Abziehen 10s in flüssigen Stickstoff getaucht wurde. Nachdem die Membran bei Raumtemperatur wieder vollständig aufgetaut war, wurde sie vorsichtig mit den Hefe-Kolonien nach oben auf einen Whatman 3MM CHR-Streifen, der vorher in Z-Puffer/X-Gal-Lösung (100ml Z-Puffer mit 270 μ l Mercaptoethanol und 1,67ml X-Gal-Stammlösung (20mg/ml in DMF)) getränkt worden

2. Material und Methoden

war, gelegt. Während der Inkubation bei 30°C wurde in regelmäßigen Zeitabständen geprüft, ob sich Kolonien blau gefärbt haben.

2.6.6. Transfer von Nukleinsäuren auf Filtermembrane

2.6.6.1. Southern-Blot

Nach der Agarose-Gelelektrophorese wurde das Gel nacheinander 45min in Denaturierungs-Puffer (1,5M NaCl, 0,5M NaOH), kurz in H₂O, 45min in Neutralisierungs-Puffer (1M Tris-HCl, pH 8, 1,5M NaCl) und kurz in 10xSSC geschwenkt. Die so denaturierte und neutralisierte DNA wurde durch Kapillarblot auf eine positiv geladene Nylonmembran transferiert (Blotting-Dauer mind. 7h, meist jedoch über Nacht; Blotting-Puffer 10xSSC), wo sie durch UV-Bestrahlung (Fluo-Link (Vilber Lourmat), 254nm 20s lang) fixiert wurde. Nach kurzem Schwenken in 5xSSC konnte mit der Hybridisierung fortgefahren werden.

2.6.6.2. Northern-Blot

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung der zu analysierenden RNA (siehe 2.6.1.5.) wurde das Gel in DEPC-H₂O gewaschen. Anschließend wurde die RNA mittels Kapillarblot unter sterilen Bedingungen auf eine positiv geladene Nylonmembran überführt. Nach UV-Bestrahlung (Fluo-Link (Vilber Lourmat), 254nm 20s lang) und kurzer Inkubation in 5xSSC konnte mit der Hybridisierung begonnen werden.

2.6.7. Herstellung Digoxigenin-markierter DNA-Sonden

Digoxigenin-markierte DNA-Sonden für die Hybridisierung mit trägergebundenen Nukleinsäuren wurden als PCR-Produkte aus Standard-PCR-Ansätzen mit den entsprechenden Plasmiden als Matrizen gewonnen, wobei anstelle der dNTPs ein Dig-Markierungs-Mix (Endkonzentrationen 100µM an dATP, dGTP und dCTP, 95µM an dTTP und 5µM an Digoxigenin-11-dUTP) eingesetzt wurde. Vor der Verwendung in Hybridisierungs-Experimenten wurden so erhaltene DNA-Sonden gelgereinigt.

2.6.8. Hybridisierung trägergebundener Nukleinsäuren und Detektion

Die Blots wurden 4h lang unter Rollen bei 42°C in Hybridisierungs-Puffer (5xSSC, 50% (v/v) Formamid, 0,1% N-Laurylsarcosin, 0,02% SDS, 2% (w/v) Blockierungsreagenz) vorinkubiert. Diese Prähybridisierungs-Lösung wurde durch frischen Hybridisierungs-Puffer ersetzt, der die denaturierte DNA-Sonde (3min, 94°C) enthielt. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 42°C. Nach dem Waschen der Membran (2x5min in 2xSSC, 0,1%SDS bei Raumtemperatur; 2x15min in 0,1xSSC, 0,1%SDS bei 68°C) wurde kurz in Maleinsäure-Puffer (100mM Maleinsäure, 150mM NaCl, pH 7,5 mit NaOH-Plätzchen; autoklaviert) und anschließend 30min in Blockierungs-Lösung (1% Blockierungsreagenz in Maleinsäure-Puffer) geschwenkt. Nachdem die Blots 30min in Antikörper-Lösung (75mU/ml anti-Digoxigenin-alkalische-Phosphatase-Fab-Fragmente in Blockierungs-Lösung) geschwenkt worden waren, wurde 2x15min in Wasch-Puffer (Maleinsäure-Puffer, 0,3% (v/v) Tween 20) und 5min in Puffer 3 (100mM Tris-HCl, 100mM NaCl, pH 9,5) gewaschen, bevor die Membran, eingeschweißt in Plastikfolie, 5min in der Färbe-Lösung (12,5µM CSPD in Puffer 3) geschüttelt wurde. Nach dem Entfernen der Färbe-Lösung wurde der so behandelte Blot 15min bei 37°C inkubiert, bevor ein Röntgenfilm (Fuji RX) exponiert und entwickelt wurde.

2.6.9. PCR

2.6.9.1. DNA als Template

PCR-Amplifizierungen wurden mit 100ng Plasmid-DNA in 10mM Tris-HCl, 50mM KCl, 1,5mM MgCl₂, pH 8,3 mit 50pmol an Oligonukleotid-Primern in Gegenwart von 100µM dNTP und 2,5U Taq DNA Polymerase durchgeführt (Gesamtvolumen 100µl). Die Reaktionsansätze waren mit Mineralöl überschichtet, die Anzahl der Zyklen lag zwischen 30 und 40. Das genaue Temperaturprogramm eines Zyklus richtete sich nach der Schmelztemperatur der verwendeten Oligonukleotid-Primer und der Länge des erwarteten PCR-Produktes: 30s bis 60s bei 94°C, 30s bis 60s bei 50°C bis 60°C, 30s bis 120s bei 72°C. Jede Amplifizierungsreaktion wurde mit einer 10min langen Inkubation bei 72°C nach dem letzten Zyklus abgeschlossen.

2.6.9.2. RT-PCR

1µg polyA⁺-RNA wurde mit 25pmol anti-sense-Primer, 5µl 5xFirst-Strand-Buffer (250mM Tris, pH 8,3, 15mM MgCl₂, 375mM KCl, 50mM DTT und 1µl RNAGuard vermischt, mit DEPC-H₂O auf 19µl aufgefüllt und 10min bei 60°C inkubiert. Nach Abkühlen auf Eis wurden 5µl 2mM dNTP und 1µl MMLV Reverse Transkriptase zugegeben und 1h bei 37°C inkubiert. Nach einem Hitze-Schritt (5min bei 94°C) wurde der Ansatz auf Eis gestellt und nacheinander zupipettiert: 10µl 10xPCR-Puffer ohne MgCl₂ (100mM Tris-HCl, 500mM KCl, pH 8,3), 3µl MgCl₂-Lösung (25mM), 25pmol anti-sense-Primer, 50pmol sense-Primer, 53µl DEPC-H₂O, 5µl dNTP (2mM) und 2,5 U Taq DNA Polymerase. Nach dem Überschichten mit Mineralöl wurde die Amplifizierung gestartet.

2.6.9.3. Semiquantitative RT-PCR [110]

Aus Fettgewebszellen wurde zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung Gesamt-RNA durch schonende Lyse gewonnen, mit Zufalls-Hexameren revers transkribiert und als Template in eine PCR eingesetzt. Das PCR-Produkt wurde im Southern-Blot nachgewiesen, quantifiziert und normiert. Um unterschiedliche Ausgangsmengen an Gesamt-RNA zu berücksichtigen, wurden die einzelnen Ergebnisse auf die jeweiligen Ergebnisse für die Amplifizierung eines Fragmentes der 18S-rRNA bezogen.

2.6.9.3.1. Zellyse

Das Zellkulturmedium wurde vollständig von den Zellen entfernt, 20µl/Well NP40-Lysepuffer (10mM Tris-HCl, pH 8,0, 10mM NaCl, 3mM MgCl₂, 2% (w/v) NP40, 0,7% (v/v) Mercaptoethanol) zugesetzt und die Zellen mit einem Zellschaber von der Kulturfläche abgelöst. Nach Zentrifugation (3min bei 13000rpm und 4°C) wurden 18µl des Überstandes vorsichtig abgenommen und in ein 0,2ml-PCR-Reaktionsgefäß pipettiert. 3µl Zellysat wurden aus diesem wieder entnommen, mit 27µl DEPC-H₂O versetzt und für die entsprechenden Kontrollen bei -20°C aufbewahrt.

Adipozyten-Zellysate wurden durch Zusatz von NP40-Lysepuffer (1/10 Volumen) zu den bei der Stromazell-Präparation angefallenen und gewaschenen Adipozyten (2.4.1.) erhalten. Nach heftigem Schütteln und Zentrifugation (5min bei 13500rpm und Raumtemperatur) wurde das klare Lysat zwischen dem Pellet aus Zelltrümmern und der Lipidphase entnommen und in die Reverse Transkription eingesetzt.

2. Material und Methoden

2.6.9.3.2. Reverse Transkription

Zu 15µl Zellysat wurden gegeben: 21µl 5xFirst-Strand-Buffer (siehe 2.6.9.2.), 10,5µl 10xZufalls-Hexamere, 20µl dNTP (2mM), 1µl MMLV Reverse Transkriptase und 1µl RNAGuard. Die anschließende Inkubation erfolgte für 2h bei 37°C.

2.6.9.3.3. PCR und Detektion

3µl dieses RT-Ansatzes wurden in eine Amplifizierungsreaktion eingesetzt und mit 3µl 10xPCR-Puffer ohne MgCl₂ (100mM Tris-HCl, 500mM KCl, pH 8,3), 3µl dNTP (2mM), je 0,6µl sense- und anti-sense-Primer (50pmol/µl), 0,9µl MgCl₂, 18,65µl H₂O und 0,25µl Taq DNA Polymerase versetzt. Nach PCR, Southern-Blot und Detektion erfolgte die video-densitometrische Auswertung der Röntgenfilme.

2.6.10. Sequenzierung von Doppelstrang-DNA

Die Sequenzierung von Plasmiden und PCR-Produkten wurde von Mitarbeitern des Institutes für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene (Leitung: Prof. Dr. H. Wolf) am Universitätsklinikum Regensburg übernommen.

2.7. Proteinchemische Methoden

2.7.1. Präparation von Protein-Extrakten aus Hefen [111]

5ml des entsprechenden SD-Selektionsmediums wurden mit einer Kolonie (Ø 2-3 mm) eines Hefe-Klons angeimpft und über Nacht bei 30°C unter Schwenken (200rpm) inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Übernachtskulturen 1min lang heftig geschüttelt, in 50ml YPD-Medium überführt und solange bei 30°C geschwenkt (200rpm) bis die Kulturen eine Dichte von OD₆₀₀=0,4-0,6 erreicht hatten (Durch Multiplikation dieses OD₆₀₀-Wertes mit dem Volumen der Kultur (55ml) wurden OD₆₀₀-Units erhalten). Die Hefekulturen wurden anschließend in Zentrifugenbechern mit dem gleichen Volumen Eis versetzt und zentrifugiert (5min bei 1000g und 4°C). Das Pellet wurde in 50ml eiskaltem Wasser resuspendiert, bevor erneut zentrifugiert, der Überstand abdekantiert und das Zellpellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurde. Bis zur Protein-Extraktion wurden die so behandelten Hefen bei -80°C gelagert.

2. Material und Methoden

Die noch gefrorenen Hefen wurden mit 60°C warmen Cracking-Puffer [hergestellt durch Mischen von 1ml Cracking-Puffer-Stammlösung (40mM Tris-HCl, pH 6,8, 8M Harnstoff, 5% (w/v) SDS, 0,1mM EDTA, 0,4mg/ml Bromphenolblau) mit 10µl Mercaptoethanol, 50µl PMSF-Stammlösung (0,1742g in 10ml Isopropanol) und 70µl Protease-Inhibitor-Lösung (0,1mg/ml Pepstatin A, 0,03mM Leupeptin, 145mM Benzamidin, 0,37mg/ml Aprotinin)] versetzt (100µl je 7,5 OD₆₀₀-Units) und schnell resuspendiert. Daraufhin wurde die Zellsuspension in ein 1,5ml-Reaktionsgefäß mit glass beads (80µl je 7,5 OD₆₀₀-Units) überführt, 10min bei 70°C inkubiert und dann 1min heftig geschüttelt. Nach Zugabe von frischer PMSF-Stammlösung (1µl je 100µl Cracking-Puffer) und Zentrifugation (5min bei 14000rpm und 4°C) wurde der Überstand in ein frisches 1,5ml-Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gestellt (Überstand 1). Das Pellet wurde 5min in einem siedenden Wasserbad aufgeköcht, 1min heftig geschüttelt, bevor erneut zentrifugiert wurde. Der so erhaltene Überstand wurde mit Überstand 1 vereinigt, kurz aufgeköcht und sofort der SDS-PAGE unterworfen (15µl), der Rest wurde bei -80°C aufbewahrt.

2.7.2. SDS-PAGE nach Laemmli

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde nach Laemmli [112] durchgeführt.

2.7.3. Silberfärbung von Gelen

Proteine in Polyacrylamid-Gelen wurden durch Silberfärbung nach Blum [113] angefärbt.

2.7.4. Western-Blotting

Auf die Anode einer Blotting-Apparatur wurden in dieser Reihenfolge geschichtet: 5 Whatman 3MM-Papiere, getränkt in Puffer 1 (0,3M Tris, pH 10,4, 20% Methanol); 3 Whatman 3MM-Papiere, getränkt in Puffer 2 (0,025M Tris, pH 10,4, 20% Methanol); Nitrocellulosemembran, getränkt in Puffer 3 (0,025M Tris, pH 9,4, 0,04M 6-Aminohexansäure, 20% Methanol); SDS-Polyacrylamidgel ohne Sammelgel; 5 Whatman 3MM-Papiere, getränkt in Puffer 3. Nach Auflegen der Kathode wurde 60min mit 1,6mA/cm² geblottet. Die Membrane wurden bis zur Immundetektion in PBS bei 4°C gelagert.

2.8. Immunologische Methoden

2.8.1. Immundetektion von Komplementfaktoren

Die Absättigung der Nitrocellulosemembran erfolgte durch Rollen des Blots in PBS, 5% Milchpulver, 0,1% NP-40 für 1h. Nach Inkubation mit dem primären Antikörper (Verdünnung in PBS, 5% Milchpulver, 0,1% NP-40) wurde 3x15 min mit PBS, 0,1% NP-40 gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (Anti-Kaninchen IgG, Peroxidase-konjugiert, 1:8000 verdünnt in PBS, 5% Milchpulver, 0,1% NP-40), bevor der Blot 3x5min mit PBS, 0,1% NP-40 und 10min in PBS gewaschen wurde. Peroxidase-markierte Antigen-Antikörper-Komplexe wurden mittels ECL-Reagenz detektiert.

Verwendete Verdünnung anti-C1s-Antikörper (SEROTEC): 1:2500.

Verwendete Verdünnung anti-C1r-Antikörper (SEROTEC): 1:5000.

2.8.2. Immundetektion von Fusionsproteinen in Hefen

Nach dem Western-Blotting erfolgte die Absättigung der Nitrocellulose-Membran durch Rollen in Blocking-Puffer (PBS, 0,25% Casein, 0,1% Tween 20) für 1h. Anschließend wurde der Blot 3x10min in Wasch-Puffer (PBS, 0,1% Tween 20) gewaschen und mit dem primären Antikörper (Antikörper HA.11, monoklonal, gerichtet gegen den Hemagglutinin-Tag des Fusionsproteins; 1:1000 in Wasch-Puffer) inkubiert (1h). Nach dem Waschen mit Wasch-Puffer (3x10min) erfolgte die Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper (Anti-Maus IgG, AP-konjugiert; 1:15000 in Wasch-Puffer) für 1h. Nach 3x10min Waschen in Wasch-Puffer erfolgte die Detektion der AP-markierten Antigen-Antikörper-Komplexe mittels Fast Red-Färbesubstrat.

3. Ergebnisse

3.1. Der Purinozeptor auf Stromazellen des humanen Fettgewebes

3.1.1. Klonierung des Bait-Konstruktes für den Two-Hybrid-Assay

Das erste Ziel dieser Arbeit bestand in der Klonierung eines cDNA-Fragmentes des in Stromazellen des humanen Fettgewebes nachgewiesenen hP2X1-Rezeptors [71], von dem aus dann die Konstruktion eines Bait-Plasmides für das Screening einer cDNA-Bank in einem Two-Hybrid-Assay möglich sein sollte.

Trotz größter Anstrengungen gelang es hierbei nicht, Bedingungen für eine RT-PCR zu etablieren, die unter Verwendung der Primer P2X1for2 und P2X1rev2 (Sequenzen siehe 2.2.4.) die Amplifizierung des gesamten kodierenden Bereiches der hP2X1-cDNA ausgehend von polyA⁺-RNA aus Stromazellen ermöglicht hätten. Das größte Fragment, im Folgenden als P2X1/800 bezeichnet, das nach RT-PCR im Southern-Blot detektiert werden konnte (Abb. 3.1), wurde durch Reverse Transkription von 1µg polyA⁺-RNA unter Verwendung des Primers pTSAR2 (Sequenz siehe 2.2.4.) und anschließender PCR unter Verwendung der Primer P2X1for1 und P2X1rev2 (Sequenzen siehe 2.2.4.) erhalten. Der Southern-Blot wurde nötig, weil die für eine PCR-Amplifizierung üblichen Cyclenzahlen (30-35 Cyclen) aufgrund der schwachen Expression dieses Rezeptors nicht ausreichten, um im ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel sichtbare Mengen an cDNA zu generieren.

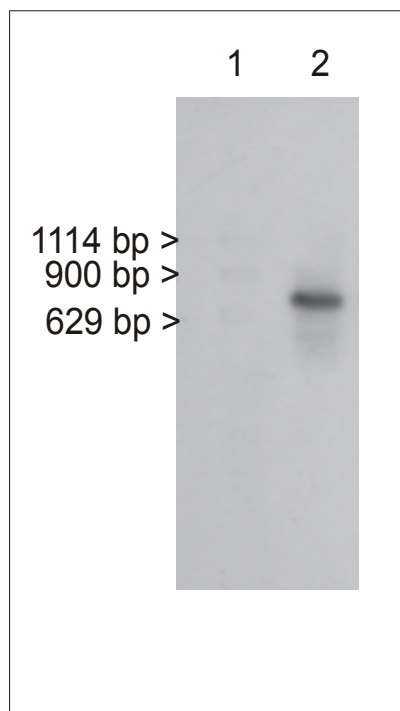


Abbildung 3.1: Detektion der cDNA P2X1/800 im Southern-Blot. 1µg polyA⁺-RNA wurden revers transkribiert (1h 30min, 37°C), die PCR (40s 94°C, 1min 58°C, 2min 30s 72°C; 35 Cyclen) wurde unter Verwendung der spezifischen Primer P2X1for1 und P2X1rev2 durchgeführt. 10µl des PCR-Ansatzes (Gesamtvolumen 100µl) wurden in einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt und mittels Kapillarblot auf eine Nylonmembran überführt. Nach Hybridisierung mit der Dig-markierten Sonde V12 (gerichtet gegen die Basen 772-1097 des rP2X1, *accession number* X80477) wurde ein Fragment der erwarteten Größe detektiert (Spur 2). Spur 1: DNA-Standard VIII, Dig-markiert.

3. Ergebnisse

Nach einer weiteren PCR-Amplifizierung mit 10 µl des erfolgreichen RT-PCR-Ansatzes als Template war die Bande im ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel sichtbar (nicht gezeigt). Die cDNA wurde aus dem Gel eluiert, in den Vektor pUC18 kloniert (siehe Abb. 3.3) und *E. coli* DH5α transformiert. Transformanten wurden durch analytische Restriktionsverdauung der Plasmid-DNA charakterisiert (nicht gezeigt), bevor die Insert-DNA eines Klonen beidseitig sequenziert wurde.

Das Insert repräsentierte wie erwartet die Basen 739-1502 der P2X1-mRNA (*accession number* NM 002558) und kodierte für die Aminosäuren K190 bis S399, umfasste also den C-terminalen Abschnitt, die Transmembrandomäne M2 und einen Teil des extrazellulären Loops (Abb. 3.2) des humanen P2X1-Rezeptors. In Anbetracht dessen, dass zu diesem Zeitpunkt immer noch nicht ausgeschlossen werden konnte, dass die Sequenz des im Fettgewebe exprimierten Purinozeptors im C-terminalen Bereich von der des hP2X1-Rezeptors abweicht und sich aufgrund der Tatsache, dass alle damals bekannten P2X-Untereinheiten Homooligomere bilden, unter den positiven Klonen eines erfolgreichen Two-Hybrid-Assays ohnehin solche finden sollten, deren Insert für den gesamten P2X1-Rezeptor des Fettgewebes kodiert, wurde an dieser Stelle nicht mehr versucht, mittels RT-PCR längere cDNA-Fragmente zu erhalten.

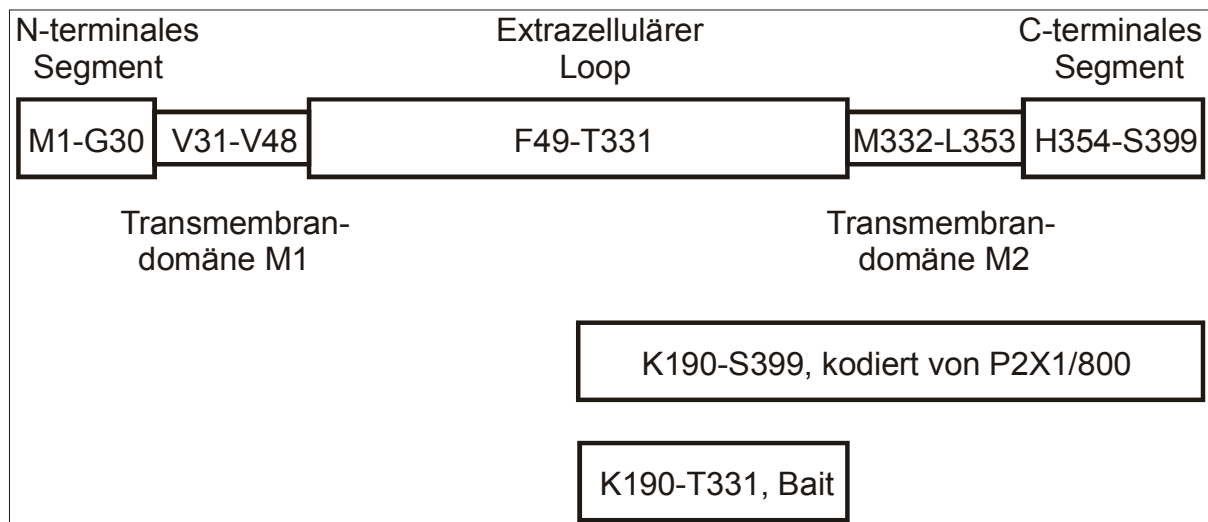


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der Aminosäuresequenz von hP2X1. Die einzelnen Segmente des Proteins sind mit ihren jeweils begrenzenden Aminosäuren bezeichnet. Das cDNA-Fragment P2X1/800 codiert für die Aminosäuren K190-S399, umfasst also das C-terminale Segment, die Transmembrandomäne M2 und einen Teil des extrazellulären Loops. Als Bait wurde die cDNA für die Aminosäuren K190-I331 verwendet.

3. Ergebnisse

Vielmehr wurde ausgehend vom Plasmid pUC18-P2X1/800 mittels PCR unter Verwendung der Primer P2X1EL1 und P2X1EL2 (Sequenzen siehe 2.2.4.), die Restriktionsschnittstellen für BamHI und Sal I enthielten, derjenige Abschnitt der cDNA amplifiziert, der für einen Teil des extrazellulären Loops kodierte, und zur Konstruktion des Bait-Plasmids herangezogen. Dazu wurde das Fragment im richtigen Leseraster in den Bait-Vektor pAS1 ligiert (Abb. 3.4). Nach Transformation von *E. coli* DH5 α wurden Transformanten durch analytische Verdauung der Plasmid-DNA charakterisiert (nicht gezeigt) und das Insert eines Klonen (pAS1-FEL) beidseitig sequenziert, um zu bestätigen, dass keine Leserasterverschiebung aufgetreten ist. Transformation eines geeigneten Hefestammes mit diesem Bait-Konstrukt hat die Expression eines Fusionsproteins aus der DNA-Bindedomäne des Transkriptionsfaktors GAL4 und dem Bait-Protein, den Aminosäuren I 331-K190 des extrazellulären Loops des humanen P2X1-Rezeptors, zur Folge.

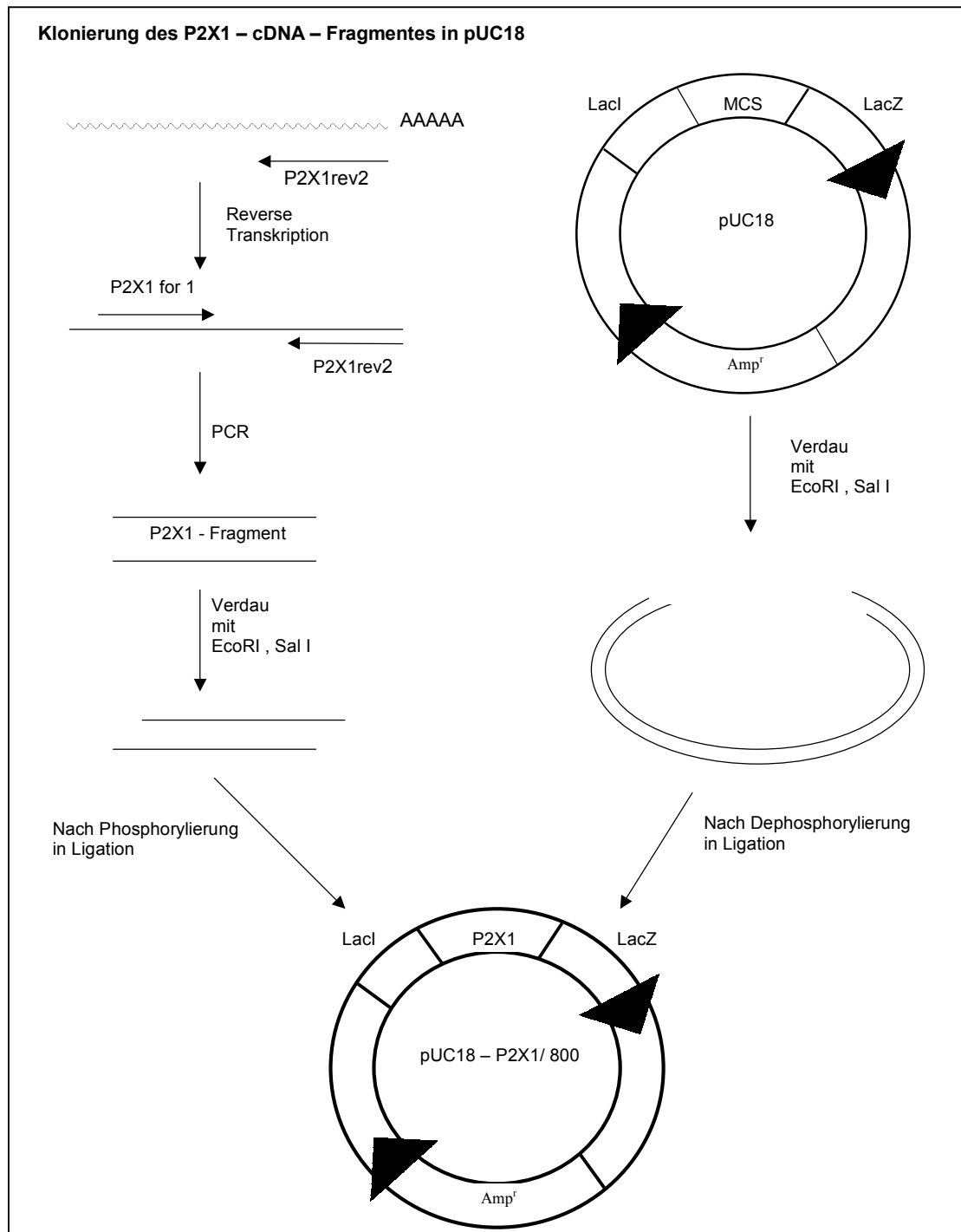


Abbildung 3.3: Diagramm zur Klonierung des cDNA-Fragmentes P2X1/800 in den Vektor pUC18. Nach PCR-Amplifizierung wurde das Fragment P2X1/800 mit den Restriktionsenzymen EcoRI und Sal I verdaut, phosphoryliert und in den vorbehandelten Vektor pUC18 (EcoRI- und Sal I-verdaut, dephosphoryliert) ligiert.

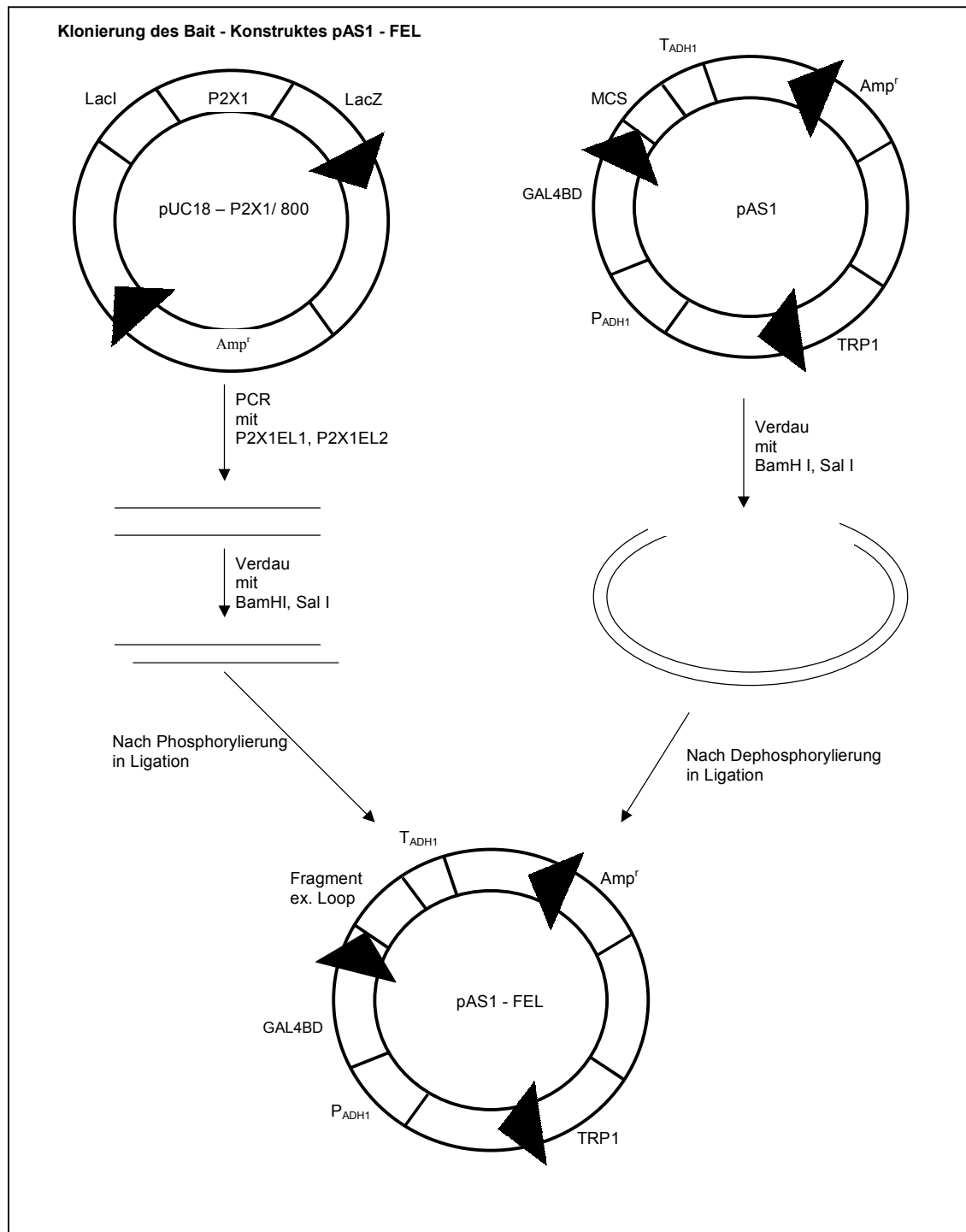


Abbildung 3.4: Diagramm zur Klonierung des Bait-Konstruktes pAS1-FEL. Nach PCR-Amplifizierung wurde das cDNA-Fragment FEL mit den Enzymen BamHI und SalI verdaut, phosphoryliert und in den vorbereiteten Vektor pAS1 (BamHI- und SalI-verdaut, dephosphoryliert) ligiert.

3.1.2. Konstruktion der cDNA-Banken

3.1.2.1. Charakterisierung der verwendeten Zellpräparationen

Da Gesamt-RNA für die Reinigung von polyA⁺-RNA, von der ausgehend die cDNA-Bank konstruiert werden sollte, aus vier verschiedenen Fettgewebspräparationen stammte, wurden die einzelnen Zellpräparationen subkultiviert und auf die Expression des Purinozeptors getestet, indem der Effekt von ATP bei der Induktion von Aromatase durch PDGF-BB und Cortisol überprüft wurde.

Bei der Subkultivierung der Stromazellen wurde standardmäßig eine entsprechend verdünnte Zellsuspension auf 12 Wells einer 24 Well-Platte ausgesät. Nachdem die Zellkulturen konfluent waren, wurde auf serumfreie Bedingungen (Medium SD9) umgestellt (Tag 0), 24h später das Medium gewechselt (Tag 1) und weitere 24h später Aromataseaktivität durch Zusatz der verschiedenen Effektoren induziert.

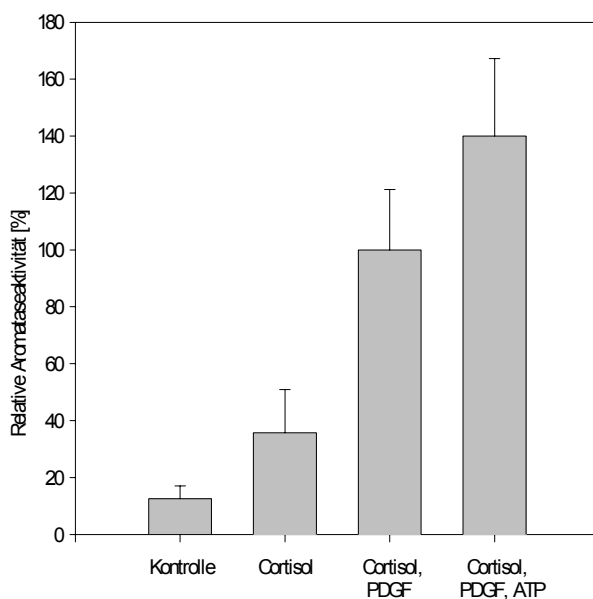


Abbildung 3.5: Relative Aromataseaktivität in Stromazellen. Die Zellen wurden für 24h in SD9 mit den angegebenen Kombinationen aus 1 μ M Cortisol, 0,5nM PDGF-BB und 500 μ M ATP inkubiert. Resultate sind Mittelwerte \pm SEM von Doppelansätzen aus den vier Zellpräparationen, aus denen mRNA zur Konstruktion der cDNA-Banken isoliert wurde. Alle Werte sind auf den Cortisol/PDGF-Wert (100%) bezogen.

Die in Abb 3.5 wiedergegebenen Ergebnisse bestätigen den purinozeptor-vermittelten Effekt von ATP auf die Induktion von Aromataseaktivität durch PDGF-BB und Cortisol [63]. Im Vergleich zur Kontrolle ohne Zusätze verdoppelt Cortisol alleine die Aromataseaktivität. PDGF-BB erhöht diesen Cortisol-Effekt um ca. das Dreifache, wobei hierbei der Zusatz von ATP die Aromatase-Aktivität um ca. 40% steigert. Mit den Zellpräparationen H456, H458, H461 und H462 wurden ausschließlich solche Zellen zur Isolierung von Gesamt-RNA bzw. mRNA herangezogen, die diesen ATP-Effekt auf die Induktion von Aromataseaktivität

3. Ergebnisse

zeigten. Dass der ATP-Effekt mit einer Erhöhung der Aromatase-Aktivität um ungefähr 40% im Bezug auf die durch PDGF-BB und Cortisol Induzierte relativ gering ausfiel, mag zum einen daran liegen, dass subkultivierte Zellen getestet wurden und hierbei im Vergleich zu primärkultivierten Stromazellen immer geringere Steigerungen zu beobachten sind. Zum anderen wurde ATP routinemäßig in einer Konzentration von 500µM eingesetzt, sodass in Abbildung 3.5 in keiner Weise der dosisabhängige Maximalwert dokumentiert sein muss.

3.1.2.2. Charakterisierung der verwendeten polyA⁺-RNA

Ausgangsmaterial für die Herstellung der cDNA-Bank war polyA⁺-RNA aus Stromazellen der vier in 3.1.2.1. getesteten Zellpräparationen. Diese wurden nach ihrer Isolierung in serumhaltigem Medium M199 ausgesät, am nächsten Tag durch mehrmaliges Waschen mit Medium M199 von nicht-adhären Zellen befreit und anschließend mit Medienwechseln an jedem 2. Tag kultiviert, bis sie konfluent waren. Zur Subkultivierung wurden die Praeadipozyten mit Trypsin-Lösung von der Kulturfläche abgelöst und entsprechend verdünnt in neue Kulturgefäße ausgesät. Nach abermaligem Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen mit Z1-Puffer gewaschen und in GIT-Puffer mittels eines Zellschabers abgeerntet. Die Isolierung von Gesamt-RNA aus so behandelten Stromazellen erfolgte durch CsCl-Gradientenzentrifugation. Nach Quantifizierung der RNA durch Messen der Absorption bei 260nm wurde sie bis zur Weiterverwendung in gefälltem Zustand bei -80°C aufbewahrt. PolyA⁺-RNA wurde aus Gesamt-RNA mit Hilfe des Oligotex mRNA-Kits (Qiagen) gereinigt.

Eine wichtige Voraussetzung bei der Konstruktion einer cDNA-Bank ist die Qualität des Ausgangsmaterials, die Intaktheit der polyA⁺-RNA also, die in die Erststrangsynthese eingesetzt werden soll. Um zu überprüfen, ob mRNA-Präparationen degradiert waren, wurden entsprechende Aliquots der Elektrophorese in einem denaturierenden, 1%igen Formaldehyd-Agarosegel unterzogen. Intakte, ethidiumbromid-gefärbte polyA⁺-RNA sollte unter diesen Bedingungen als "Schmier" von 0,5 bis 9kb erscheinen, wobei die Banden für die ribosomalen RNAs fehlen sollten.

Abbildung 3.6 zeigt Aliquots der mRNA-Präparationen, die zur Konstruktion der cDNA-Banken 1 und 2 herangezogen wurden. Für beide Präparationen wurde nach denaturierender Formaldehyd-Agarosegelelektrophorese der erwartete "Schmier" detektiert, der sich von ca. 0,5kb bis deutlich über 6,9kb erstreckte. Die 28S- und 18S-Banden fehlten, sodass beide mRNA-Pools als intakt und von ihrer Qualität her geeignet für die Herstellung einer cDNA-Bank erschienen.

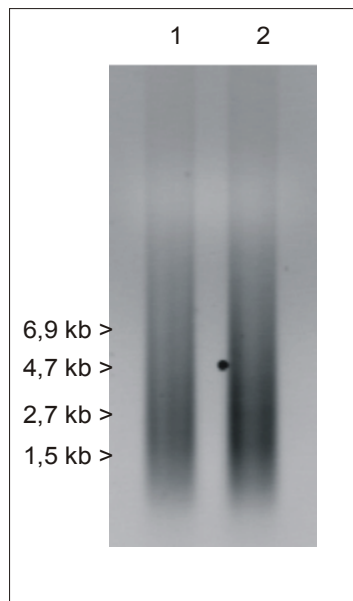


Abbildung 3.6: Analyse der verwendeten polyA⁺-Präparationen. PolyA⁺-RNA aus den jeweiligen Zellpräparationen wurde in einem denaturierenden, 1%igen Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt und auf ihre Intaktheit hin geprüft.

Spur 1: 0,7µg polyA⁺-RNA aus den Zellpräparationen H456 und H458.

Spur 2: 0,7µg polyA⁺-RNA aus den Zellpräparationen H461 und H462.

3.1.2.3. Konstruktion der cDNA-Banken

Nach der Isolierung ausreichender Mengen polyA⁺-RNA aus Stromazellen des humanen Fettgewebes wurden mit Hilfe des Two-Hybrid cDNA Library Construction-Kits (CLONTECH) zwei cDNA-Banken hergestellt (Abb. 3.7). Ausgangsmaterial waren jeweils 10µg mRNA, die mit MMLV Reverser Transkriptase unter Verwendung von Oligo(dT)₂₅(dN)-Primern (N = A, C oder G) bzw. Zufallshexameren p(dN)₆ revers transkribiert wurden, um die Komplexität der cDNA-Bank zu erhöhen. Die Zweitstrangsynthese erfolgte nach der Methode von Gubler und Hoffman [129] mit einem Enzymgemisch aus *E. coli* DNA Polymerase I, *E. coli* RNase H und *E. coli* DNA Ligase. Dabei wurde die RNase H-Aktivität dazu verwendet, „nicks“ in den RNA-Strang einzuführen, wobei dann ausgehend von so entstandenen RNA-Primern *E. coli* DNA Polymerase I in Gegenwart der vier Desoxy-Nukleotide einen komplementären DNA-Strang erzeugte. DNA Ligase verband die gebildeten DNA-Fragmente zu einem zusammenhängenden cDNA-Strang. Die Effizienz von Erst- und Zweitstrangsynthese wurde durch Zusatz von [α-³²P]dCTP kontrolliert (nicht gezeigt). Nach der Erzeugung von bündigen Enden durch Behandlung mit T4 DNA Polymerase wurden EcoRI-Adaptoren (Sequenz siehe 2.6.4.) an die doppelsträngige cDNA ligiert, um einen Restriktionsverdau zu umgehen und so die Fragmentgrößen zu erhalten, phosphoryliert und an einer Gelfiltrations-Säule nach Größe fraktioniert. Entsprechende Fraktionen wurden gepoolt, wobei Fragmente, die kleiner als 300bp waren, zusammen mit den überschüssigen Nukleotiden und Adaptoren abgetrennt

3. Ergebnisse

wurden. Nachdem mit Aliquots dieser cDNA-Pools ausgetestet worden war, in welchem Verhältnis die cDNA in eine Ligation mit vorverdauten, dephosphorylierten Vektor pGAD10

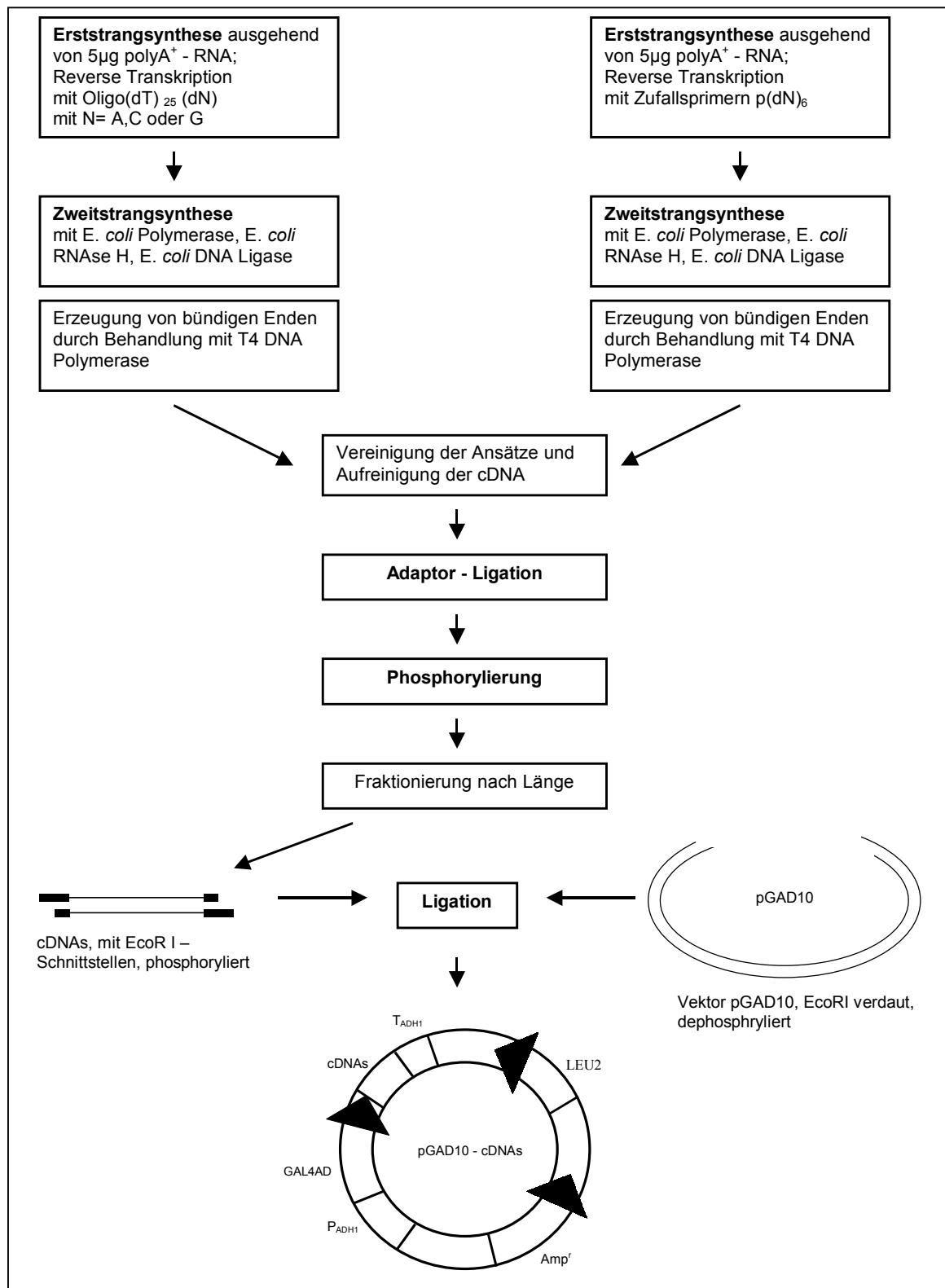


Abbildung 3.7: Flußdiagramm zur Konstruktion der cDNA-Banken. Erklärung siehe Text.

3. Ergebnisse

eingesetzt werden muss, um maximale Effizienz der Ligation zu erreichen, wurde diese Ligation mit der restlichen Menge an cDNA durchgeführt, *E. coli* DH5 α durch Elektroporation transformiert und Aliquots dieser Transformationsansätze auf LB_{amp}-Agarplatten ausplattiert, um die Zahl der Klone abzuschätzen. Transformationsansätze, die erfolgreich waren, wurden durch Ausplattieren des gesamten Volumens auf mehrere LB_{amp}-Agarplatten amplifiziert, in LB_{amp}-Medium abgerntet und durch Zugabe von Glycerin für die Langzeitlagerung bei –80°C präpariert.

3.1.2.4. Charakterisierung der cDNA-Banken

3.1.2.4.1. Allgemeines

Nachfolgend sind in Tabelle 3.8 allgemeine Informationen zur Charakterisierung der beiden cDNA-Banken 1 und 2 aufgeführt.

Die Stromazellpräparationen, aus denen mRNA zur Konstruktion der jeweiligen Bank isoliert worden ist, stammten aus subcutanen Fettdepots von je zwei Spenderinnen, denen entsprechende Gewebeproben bei Reduktionsplastiken entfernt worden waren. Für die cDNA-Bank 1 wurde mRNA aus den Präparationen H456 (weibl., 36 Jahre, Brust) und H458 (weibl., 27 Jahre, Brust) verwendet, für die cDNA-Bank 2 aus den Präparationen H461 (weibl., 56 Jahre, Brust) und H462 (weibl., 43 Jahre, Bauch).

Die Anzahl der Klone wurde durch das Auszählen der Kolonien, die nach Ausplattieren eines Aliquots des Transformationsansatzes auf LB_{amp}-Agarplatten hochwuchsen, bestimmt und auf das Gesamtvolumen des Transformationsansatzes hochgerechnet. Wenn mehrere Transformationsansätze vor der Amplifizierung vereinigt wurden, so wurden die Klonzahlen addiert. Sie wurden für die cDNA-Bank 1 mit 400000, für die cDNA-Bank 2 mit 180000 bestimmt, wobei Two-Hybrid-cDNA-Banken mit über 10⁶ Klonen als qualitativ ausgezeichnet gelten.

Zur Titerbestimmung wurden vor der Zugabe von Glycerin für die Langzeitlagerung Aliquots der Bakteriensuspensionen entnommen und in verschiedenen Verdünnungen auf LB_{amp}-Agarplatten ausplattiert, sodass über die Anzahl der über Nacht bei 37°C hochgewachsenen Kolonien bestimmt werden konnte, wie viele Kolonien man beim Ausplattieren eines Milliliters erhalten würde. Der Titer der cDNA-Bank 1 beträgt 2,8 x 10⁹cfu/ml, derjenige der cDNA-Bank 2 4 x 10⁹cfu/ml, sodass beide Titer im für die Langzeitlagerung optimalen Bereich liegen.

3. Ergebnisse

	cDNA-Bank 1	cDNA-Bank 2
polyA ⁺ -RNA aus	H456, H458	H461, H462
Titer [cfu/ml]	2,8 x 10 ⁹	4 x 10 ⁹
Anzahl der Klone	400 000	180 000
Vektor	pGAD10	pGAD10
Bakterienstamm	<i>E. coli</i> DH5 α	<i>E. coli</i> DH5 α

Tabelle 3.8: Daten zur Charakterisierung der konstruierten cDNA-Bänke. Erklärung siehe Text.

Der Vektor, in den die cDNAs ligiert worden sind, war in beiden Fällen pGAD10, der Bakterienstamm, der zur Amplifizierung verwendet wurde, *E. coli* DH5 α .

Transformation eines geeigneten Hefestammes mit Plasmid-DNA aus den cDNA-Banken (pGAD10-cDNAs) resultiert in der Expression von Fusionsproteinen aus der Aktivierungsdomäne des Transkriptionsfaktors GAL4 und Proteinen, für die die Insert-DNAs kodieren. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass sich theoretisch, so wie die cDNA-Banken hergestellt worden sind, nur 1/6 der cDNA-Inserts im richtigen Leseraster relativ zur Aktivierungsdomäne befinden.

3.1.2.4.2. Analyse der Insertgrößen

Weiteren Aufschluss über die Qualität einer Genbank gibt die Anzahl der rekombinanten Klone, also die Zahl der Klone, die Plasmid-DNA mit Insert tragen, und der Bereich, in dem sich diese Insertgrößen bewegen. Um beides zu untersuchen, wurden Aliquots der beiden cDNA-Banken 1 und 2 auf LB_{amp}-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurden je Genbank 10 Klone zufällig entnommen und Übernachtskulturen in LB_{amp}-Medium angeimpft. Um zu analysieren, wie viele der isolierten Klone Plasmide mit Insert tragen und wie groß diese Inserts gegebenenfalls sind, wurde die Plasmid-DNA der Klone isoliert und je 1µg mit dem Restriktionsenzym EcoRI verdaut. Die Verdauungen wurden anschließend der Elektrophorese in einem 2%igen Agarosegel unterzogen.

Die Abbildungen 3.9 und 3.10 dokumentieren die Ergebnisse. Für die cDNA-Bank 1 zeigte sich, dass mit acht von zehn Klonen eine relativ hohe Anzahl Plasmid-DNA mit Insert trägt, wobei die Insertgrößen zwischen 400bp und 1000bp liegen. Sechs von zehn Klonen der

3. Ergebnisse

cDNA-Bank 2 tragen Plasmid-DNA mit Insert, die Insertgrößen schwanken ebenfalls zwischen 400bp und 1000bp.

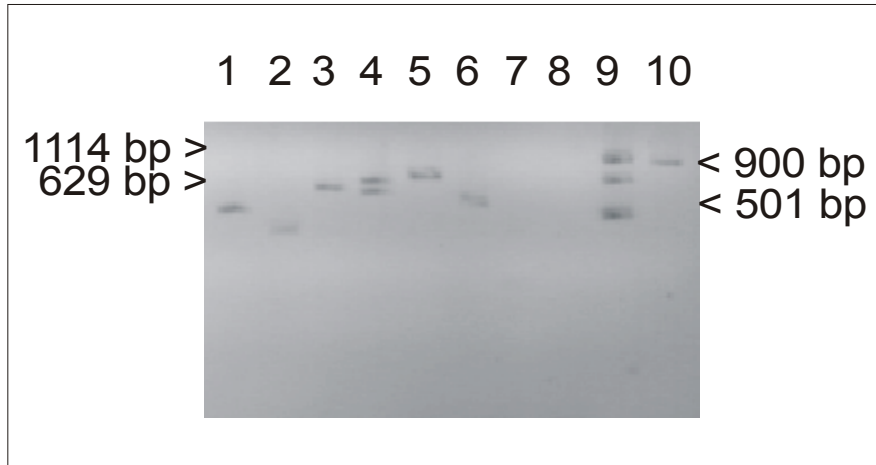


Abbildung 3.9: EcoRI-Verdau von Plasmid-DNA aus zehn zufällig ausgewählten Klonen der cDNA-Bank 1. Verdaut wurden 1µg Plasmid-DNA, die Verdauungen wurden im 2%igen ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel aufgetrennt. Acht von zehn Plasmiden enthielten Insert-DNA, die Insertgrößen lagen zwischen 400bp und 1000bp.

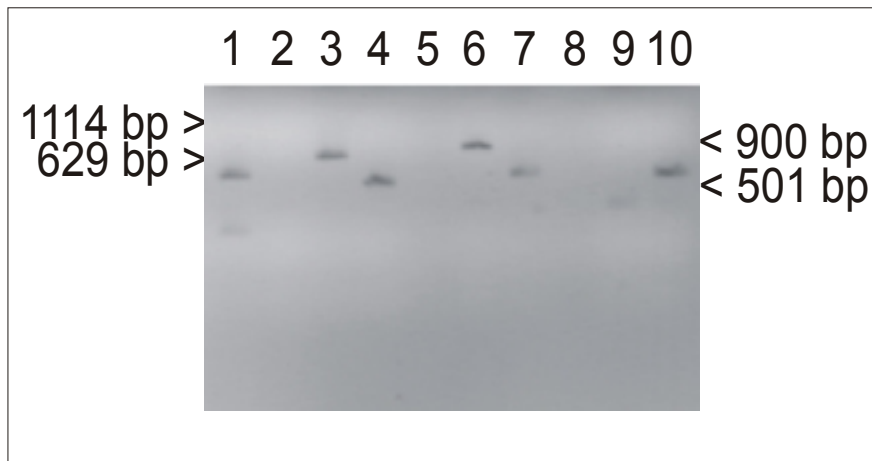


Abbildung 3.10: EcoRI-Verdau von Plasmid-DNA aus zehn zufällig ausgewählten Klonen der cDNA-Bank 2. Verdaut wurden 1µg Plasmid-DNA, die Verdauungen wurden im 2%igen ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel aufgetrennt. Sechs von zehn Plasmiden enthielten Insert-DNA, die Insertgrößen lagen zwischen 400bp und 1000bp.

3. Ergebnisse

3.1.2.4.3. Der P2X1-Rezeptor ist in der cDNA-Bank 1 repräsentiert

Um zu überprüfen, ob der P2X1-Rezeptor in einer der Genbanken repräsentiert ist, wurde 10ml LB_{amp}-Medium mit je 1µl der cDNA-Banken 1 und 2 angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln (180rpm) inkubiert. Nach Isolierung der Plasmid-DNA aus 4ml dieser Übernachtskulturen wurde diese als Matrize in einen Standard-PCR-Ansatz eingesetzt, wobei unter Verwendung der spezifischen Primer P2X1EL1 und P2X1EL2 versucht wurde, das 440bp-Fragment, das auch bei der Konstruktion des Bait-Plasmides Verwendung fand, zu amplifizieren.

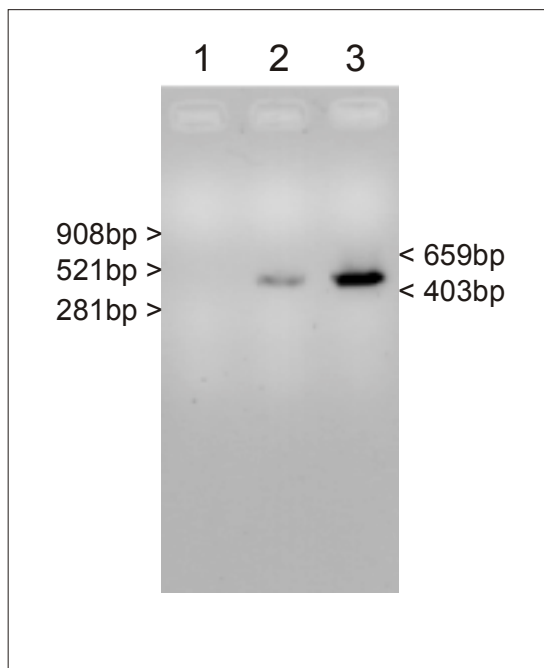


Abbildung 3.11: Fragment FEL als PCR-Produkt ausgehend von Plasmid-DNA der cDNA-Bank 1. 200ng Plasmid-DNA aus der cDNA-Bank 1 wurden als Matrize in eine Standard-PCR (35 Cyclen mit 30s 94°C, 30s 59°C, 30s 72°C) unter der Verwendung der Primer P2X1EL1 und P2X1EL2 eingesetzt. Im 2%igen Agarosegel wurde ein 440bp-Fragment detektiert, das durch Sequenzierung als der Teil des P2X1-Rezeptors identifiziert wurde, der als Bait verwendet wurde.

Spur1: Kontroll-PCR ohne Template
Spur2: 5µl (1/20) des PCR-Ansatzes
Spur3: 15µl (3/20) des PCR-Ansatzes

Ausgehend von Plasmid-DNA aus der cDNA-Bank 1 konnten PCR-Bedingungen optimiert werden, die zur Amplifizierung eines Fragmentes entsprechender Größe führten. Die Sequenzierung dieses PCR-Produktes bestätigte, dass es sich hierbei um die Basen 741-1167 der P2X1-cDNA (*accession number* NM 002558) handelt, und cDNA dieses Rezeptors zumindest in der cDNA-Bank 1 repräsentiert ist.

3.1.3. Two-Hybrid-Screening der cDNA-Bank 1

Yeast Two-Hybrid-Assays, denen die Funktionalität des Transkriptionsfaktors GAL4 zugrunde liegt, machen sich die Tatsache zunutze, dass sich die räumliche Struktur von GAL4, wie die vieler eukaryotischer Transkriptionsfaktoren, in funktionelle Domänen unterteilen lässt. Man findet eine DNA-Bindedomäne, die an eine spezifische Enhancer-Sequenz, in Hefen bezeichnet man diese als *upstream activating sequence* (UAS), bindet und räumlich von dieser getrennt eine Aktivierungsdomäne, die den RNA Polymerase II-Komplex zum zu transkribierenden Gen dirigiert.

Exprimiert man separate Peptide für die DNA-Bindedomäne und die Aktivierungsdomäne von GAL4 in Hefe, so ist die Bildung eines funktionsfähigen Transkriptionsfaktors nicht möglich. Eine Methode, die Funktionalität von GAL4 zurückzuerhalten, besteht darin, DNA-Bindedomäne und Aktivierungsdomäne als Teile von Fusionsproteinen zu exprimieren, die miteinander interagieren. Dieses Prinzip impliziert die Möglichkeit zum Screening von cDNA-Banken nach Proteinen (Targets), die mit einem bekannten Protein (Bait) wechselwirken, und sei anhand des durchgeführten Screenings erläutert:

Im konkreten Fall fungierte ein Fragment des extrazellulären Loops des humanen P2X1-Rezeptors (Aminosäuren I331-K190) in einem Fusionsprotein mit der DNA-Bindedomäne von GAL4 (Aminosäuren 1-147) als Bait; es sollte nach Wechselwirkungspartnern für P2X1 gesucht werden. Die Genbank-Plasmide pGAD10-cDNAs kodierten für Fusionsproteine aus Segmenten von Proteinen, die in Stromazellen des humanen Fettgewebes exprimiert sind, und der Aktivierungsdomäne des Transkriptionsfaktors GAL4. Nach Cotransformation geeigneter Hefestämme würde sich bei Interaktion von Bait- und Target-Protein ein GAL4-analoger Transkriptionsfaktor mit der entsprechenden Affinität zu einer GAL4-UAS ergeben und zum Transkriptionsstart von so kontrollierten Genen führen.

Verwendet wurden die Hefestämme Y190 und CG-1945, die insofern für den beschriebenen Two-Hybrid-Assay geeignet sind, als sie die Reportergene *lacZ* und *HIS3* unter der Kontrolle einer UAS für GAL4 im Genom integriert enthalten. Die Expression des Genproduktes von *HIS3* ermöglicht Hefen mit funktionellem GAL4 das Wachsen in Abwesenheit von Histidin, *lacZ* codiert für die β -Galaktosidase, die in entsprechenden Farbreaktionen nachgewiesen werden kann. Davon unabhängig sind als auxotrophe Marker Leucin (*leu2*) und Tryptophan (*trp1*) enthalten. Die beiden Hefestämme sind zudem *gal4⁻* und *gal80⁻*, um die regulatorische Wirkung nativer Proteine auszuschließen.

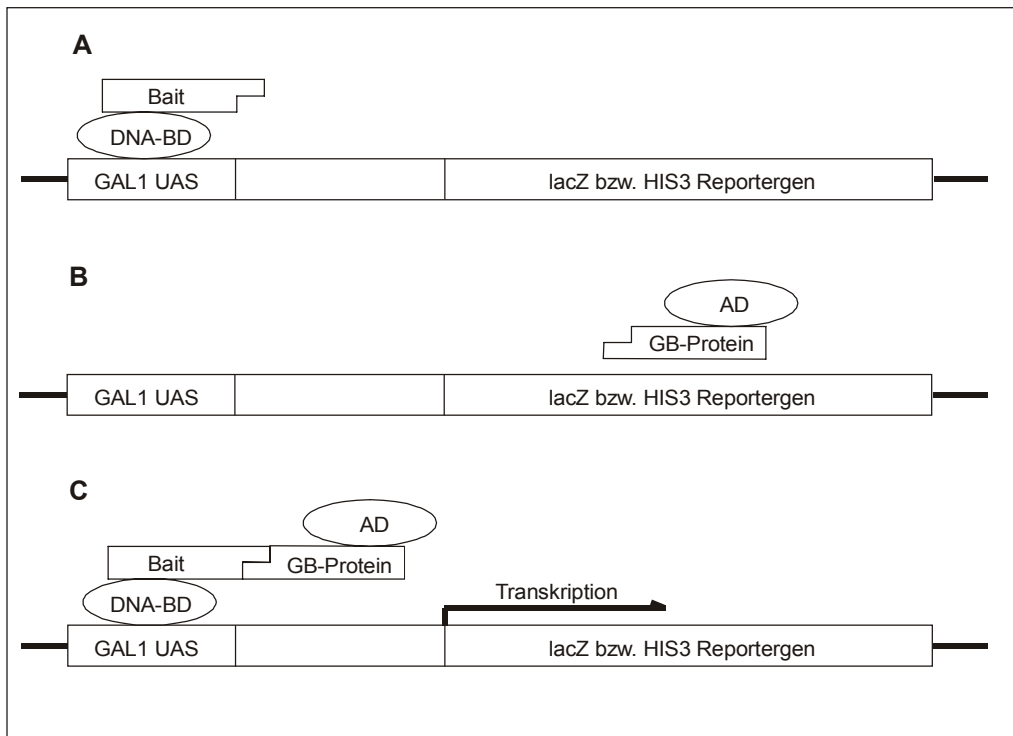


Abbildung 3.12: Schematische Darstellung eines Two-Hybrid-Assays, GAL4 basierend. Weder das Fusionsprotein aus DNA-Bindedomäne GAL4/Bait (DNA BD Bait) noch die Fusionsproteine aus Aktivierungsdomäne GAL4/Genbank-Proteinen (AD Protein aus Genbank) können die Transkription der Reportergene *lacZ* bzw. *HIS3* aktivieren (A, B). In vivo-Wechselwirkung zwischen dem Bait-Protein und einem Protein der Genbank in den entsprechenden Fusionsproteinen stellt die Funktionalität des Transkriptionsfaktors GAL4 her und aktiviert die Transkription der Reportergene (C).

3.1.3.1. Expression des Baits

Vor der Durchführung des eigentlichen Two-Hybrid-Assays musste erst bestätigt werden, dass die beiden Hefestämme Y190 und CG-1945 das Bait-Protein nach Transformation mit dem Plasmid pAS1-FEL auch exprimieren, dass dieses nicht toxisch für die Hefen ist und dass das Bait-Protein nicht alleine zur Aktivierung der beiden Reportergene führt.

Y190 und CG-1945 wurden mit dem Plasmiden pAS1 und pAS1-FEL transformiert, Aliquots der Transformationsansätze verdünnt auf SD/-Trp bzw. auf SD/-Trp/-His ausplattiert und mehrere Tage lang bei 30°C inkubiert, wobei in regelmäßigen Abständen das Hochwachsen von Kolonien überprüft wurde. Während sich auf den SD/-Trp-Platten nach 4-5 Tagen für beide Hefestämme ungefähr gleich viele Kolonien fanden, die Transformationen also in etwa mit der gleichen Effizienz abgelaufen waren, wurden auf den SD/-Trp/-His-Platten nach 8 Tagen für beide Hefestämme unabhängig vom eingebrachten Plasmid sehr kleine Kolonien sichtbar, die jedoch auf die beschriebene schwache Expression des His3-Proteins in diesen Hefestämmen zurückzuführen war [114]. Gestützt wurde diese These von der Beobachtung,

3. Ergebnisse

dass Transformanten, die ohne Histidin gewachsen sind, im folgenden β -Galaktosidase-Assay negativ waren (nicht gezeigt) und dass dieses "Background"-Wachstum durch 25mM 3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT), einem kompetitiven Inhibitor des His3-Proteins, als Mediumzusatz fast vollständig unterdrückt werden konnte (nicht gezeigt). Es wurde gefolgert, dass das Bait-Protein weder für Y190 noch für CG-1945 toxisch ist und in keinem der beiden Hefestämme die Expression des Bait-Proteins alleine zur Aktivierung der Reportergene führt, beide Hefestämme also für den beabsichtigten Two-Hybrid-Assay geeignet waren.

Um zu überprüfen, ob das Bait-Protein in den beiden Hefestämmen auch exprimiert wird, wurden Proteinextrakte der verschiedenen Transformanten durch Western Blot-Technik auf die Anwesenheit des Fusionsproteins hin untersucht, wobei der primäre monoklonale Antikörper gegen den Hemagglutinin-Tag (Sequenz: CYPYDVPDYASL) des Fusionsproteins gerichtet war. Im Proteinextrakt sowohl aus Y190 als auch aus CG-1945 wurde nach Transformation mit dem Bait-Plasmid pAS1-FEL ein Protein von der für das Fusionsprotein erwarteten Größe von 35 kDa nachgewiesen (siehe Abb. 3.13). Darüber hinaus wurden in beiden Hefestämmen zwei kleinere Banden detektiert, die als Abbauprodukte des Bait-Proteins interpretiert wurden.

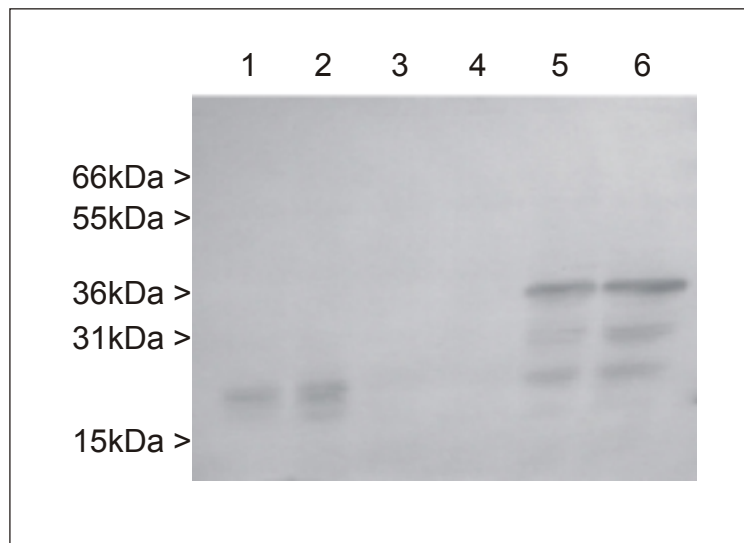


Abbildung 3.13: Western-Blot zum Nachweis des Bait-Proteins in Transformanten von Y190 und CG-1945. Proteinextrakte aus Y190/pAS1 (Spur 1), CG-1945/pAS1 (2), Y190 (3), CG-1945 (4), Y190/pAS1-FEL (5) und CG-1945/pAS1-FEL (6) wurden im SDS-Polyacrylamidgel (10%) aufgetrennt. Im Western Blot konnte das Bait-Protein in den Transformanten beider Hefestämme nachgewiesen werden (5, 6), ebenso die DNA-Bindedomäne von Gal4 (19kDa), die nach Transformation mit pAS1 exprimiert wird (1, 2). Proteinextrakte der Wildtyp-Stämme liefern keine Signale (3, 4).

3. Ergebnisse

3.1.3.2. Two-Hybrid-Assays

Um die cDNA-Bank 1 nach Proteinen zu screenen, die mit dem Bait-Protein interagieren, wurden das Bait-Plasmid pAS1-FEL und Plasmid-DNA der cDNA-Bank 1 aus Übernachtskulturen in LB_{amp}-Medium isoliert, mit dem GeneClean II-Kit (Dianova) aufgereinigt und quantifiziert. Die Hefestämme Y190 und CG-1945 wurden mit den beiden Plasmiden cotransformiert, wobei im Vergleich zum cDNA-Bank-Plasmid die doppelte Menge an Bait-Plasmid eingesetzt wurde (vgl. Tabelle 3.14). Die Transformationsansätze wurden auf SD/-Leu/-Trp/-His/+3-AT (25mM) ausplattiert, über mehrere Tage hinweg bei 30°C inkubiert und auf Kolonien, die ohne Histidin hochwachsen, geprüft. Spätestens nach zehn Tagen wurden relevante Kolonien entnommen, erneut ausgestrichen und bei 30°C inkubiert, bis die Kolonien groß genug waren (2-3mm im Durchmesser), um im β -Galaktosidase-Assay auf die Aktivierung des zweiten Reportergens untersucht zu werden.

	Assay 1	Assay 2	Assay 3	Assay 4
Hefestamm	Y190	Y190	CG-1945	CG-1945
Bait-Plasmid [µg]	100	500	100	500
Plasmid aus cDNA-Bank [µg]	50	250	50	250
Klone, getestet im X-Gal Assay	25	60	3	25
Effizienz [cfu/µg]	—	2000	—	1550

Tabelle 3.14: Durchgeführte Two-Hybrid-Assays. Der Tabelle sind die bei den durchgeführten Two-Hybrid-Assays verwendeten Hefestämme, die eingesetzten Mengen an Bait-Plasmid bzw. Genbank-Plasmid und die Anzahl der Klone aus den entsprechenden Assays angegeben, die im β -Galaktosidase-Assay getestet wurden. Außerdem ist die Transformationseffizienz zu entnehmen, die über das Ausplattieren von Aliquots der Transformationsansätze auf SD/-Leu/-Trp ermittelt wurden.

3. Ergebnisse

3.1.3.3. Klon K37/2

Kolonien, die ohne Histidin hochgewachsen sind, was auf die Expression des His3-Proteins deutet, wurden in einem β -Galaktosidase-Assay auf die Aktivierung des zweiten Reportergens *lacZ* geprüft. Mit Ausnahme des Klons 37 aus Assay 2 (Abbildung 3.15) waren alle untersuchten Klone *lacZ*⁻, im β -Galaktosidase-Assay stellte sich keine Blaufärbung ein.

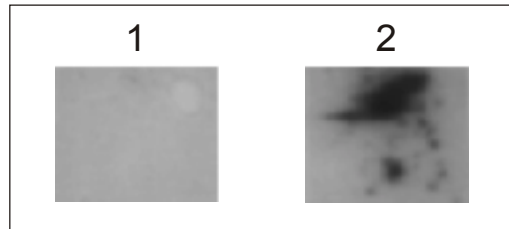


Abbildung 3.15: β -Galaktosidase-Assay von Y190-Transformanten. In der Transformante Y190/pAS1-FEL führt die Expression des Bait-Proteins alleine nicht zur Aktivierung des Reportergens *lacZ* (1), Klon K37/2 ist *lacZ*⁺ (2).

Um zu untersuchen, für welches Protein der cDNA-Bank 1 das Target-Plasmid des Klons K37/2 codiert, wurde Plasmid-DNA aus der Transformante isoliert und *E. coli* DH5 α retransformiert. Die Retransformanten wurden mittels Insert-PCR (Primer 5' AD LD-ISP und 3' AD LD-ISP, Sequenzen siehe 2.2.4.) charakterisiert. Neben Klonen, die das Bait-Plasmid pAS1-FEL trugen, wurden solche identifiziert, die ein ca. 900bp langes Insert im Target-Vektor pGAD10 enthielten. Nach der Reinigung dieser Plasmid-DNA aus einer Übernachtskultur in LB_{amp}-Medium wurde das Insert beidseitig sequenziert.

Die Sequenzierung ergab, dass es die Basen 14–914 der mRNA des humanen Komplementfaktors C1s (*accession number* M18767) repräsentierte und in der verkehrten Orientierung im Vektor pGAD10 enthalten war. Somit war auch dieser Klon als falsch positiv zu charakterisieren, mit der C1s-mRNA wurde aber zum ersten Mal die Expression eines Komplementfaktors des klassischen Aktivierungsweges in Stromazellen des humanen Fettgewebes nachgewiesen.

3.1.4. Isolierung des fehlenden P2X1-Fragmentes

In Anbetracht der Tatsache, dass die durchgeführten Two-Hybrid-Assays weder Sequenzinformationen über die P2X1-Rezeptoruntereinheit der Stromazellen noch solche über andere Untereinheiten lieferten, sollte abschließend zumindest geklärt werden, ob sich die P2X1-Rezeptoruntereinheit von der in der Literatur beschriebenen unterscheidet, also eine Splice-Variante vorliegt. Nachdem mehrere Versuche, in der cDNA-Bank 1 enthaltene Klone über eine PCR-Technik zu isolieren, gescheitert waren (nicht gezeigt), wurde nochmals versucht, das 5'-Ende der kodierenden Sequenz unter Verwendung P2X1-spezifischer Primer in RT-PCR-Ansätzen ausgehend von mRNA aus Stromazellen des humanen Fettgewebes zu amplifizieren. Ein Ansatz, bei dem 1µg mRNA mit dem Primer P2X1EL2 revers transkribiert wurde und die anschließende Amplifizierung in einer step-down-PCR unter Verwendung der Primer P2X1EL2 und P2X1newa (Sequenzen siehe 2.2.4.) erfolgte, lieferte ein cDNA-Fragment der erwarteten Größe, das nach Elektrophorese in einem 2%igen Agarosegel und anschließendem Southern-Blot, der aufgrund der niedrigen Transkriptionsrate der P2X1-mRNA nötig war, detektiert werden konnte (Abb. 3.16). Nach einer „nested“-PCR mit den Primern P2X1newa und P2X1revc und 5µl des erfolgreichen RT-PCR-Ansatz als Template war die Bande im 2%igen ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel sichtbar (nicht gezeigt) und konnte eluiert und sequenziert werden.

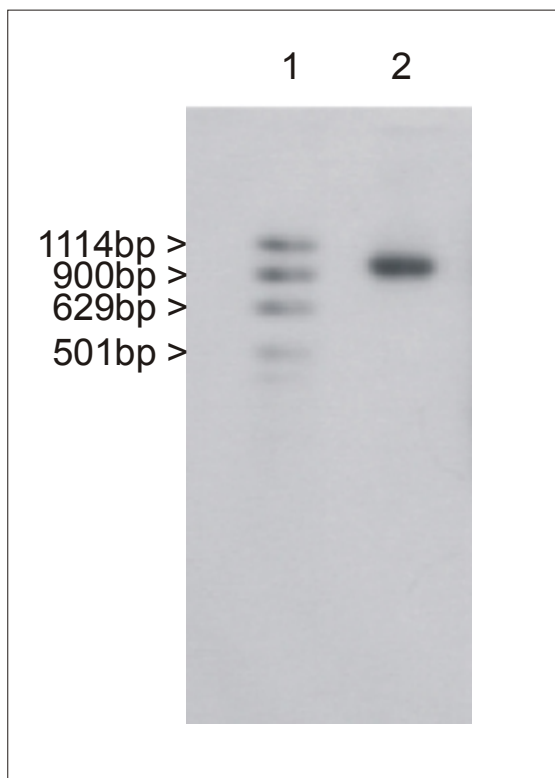


Abbildung 3.16: Detektion des cDNA-Fragmentes P2X1/1000 im Southern-Blot. 1µg polyA⁺-RNA waren revers transkribiert worden (1h 30min 37°C), die Amplifizierung erfolgte unter Verwendung der Primer P2X1EL2 und P2X1newa (30s 94°C, 30s T_A, 1min 10s 72°C mit 3 Cyclen bei T_A=60°C, 3 Cyclen bei T_A=58°C und 30 Cyclen bei T_A=56°C). 10µl des Ansatzes (V=100µl) wurden im 2%igen Agarosegel aufgetrennt, nach dem Kapillarblot erfolgte die Hybridisierung mit einer Dig-markierten Sonde, die gegen das P2X1-Fragment FEL gerichtet war.
Spur 1: DNA-Standard VIII, Dig-markiert.
Spur 2: RT-PCR-Ansatz.

3. Ergebnisse

Die Sequenzierung bestätigte, dass dieses cDNA-Fragment wie erwartet die Basen 174-1162 der P2X1-mRNA (*accession number* NM 002558) repräsentierte, in Verbindung mit dem vorher isolierten Fragment P2X1/800 also der gesamte kodierende Bereich dieser mRNA in Stromazellen des humanen Fettgewebes nachgewiesen war und somit die Existenz einer Splice-Variante ausgeschlossen werden konnte.

3.2. Komplementfaktoren des klassischen Aktivierungsweges in humanen Praeadipozyten

3.2.1. Nachweis der C1s-mRNA durch Northern-Blot-Technik

Aus der cDNA-Bank 1 (siehe Abschnitt 3.1.2.), hergestellt aus polyA⁺-RNA humaner Praeadipozyten, konnte ein cDNA-Fragment isoliert werden, das für ein Teil des humanen Komplementfaktors C1s kodiert (siehe Abschnitt 3.1.3.3.). Bisher ist die Expression von Komplementfaktoren des klassischen Aktivierungsweges in humanen Praeadipozyten noch nicht beschrieben. Dieses Ergebnis sollte durch Nachweis der C1s-mRNA im Northern-Blot bestätigt werden.

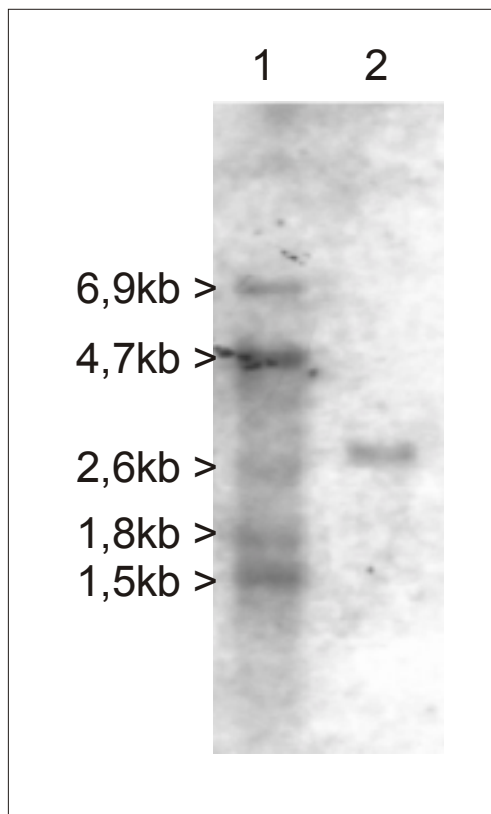


Abbildung 3.17: Nachweis der C1s-mRNA durch Northern-Blot-Technik.

0,5µg polyA⁺-RNA aus humanen Praeadipozyten wurden in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und mittels Kapillarblot auf eine Nitrocellulosemembran überführt. Nach Hybridisierung mit einer dig-markierten DNA-Sonde, gerichtet gegen die Basen 14-914 der C1s-mRNA (*accession number* M18767), wurde eine Bande der erwarteten Größe (2,9kb) detektiert (Spur 2). Spur 1: RNA-Standard II, dig-markiert.

Nach Hybridisierung mit einer spezifischen DNA-Sonde konnte die Vollängen-mRNA für C1s in polyA⁺-RNA aus humanen Praeadipozyten nachgewiesen werden (Abb. 3.17), es wurde im Northern-Blot erwartungsgemäß eine mRNA der Größe 2,9kb detektiert.

3. Ergebnisse

3.2.2. Nachweis weiterer Komplementfaktoren des klassischen Aktivierungsweges in der cDNA-Bank 1

Der Nachweis der mRNA des Komplementfaktors C1s in humanen Praeadipozyten zog zwangsläufig die Frage nach der Expression weiterer Komplementfaktoren des klassischen Aktivierungsweges in diesen Zellen nach sich.

Um zu untersuchen, ob neben der cDNA von C1s andere Komplementfaktoren in der cDNA-Bank 1 repräsentiert waren, sollten entsprechende cDNA-Fragmente, die für die Proteine C1r, C1q, C2 und C4 kodieren, durch PCR mit Plasmid-DNA aus der cDNA-Bank 1 als Template amplifiziert werden. Unter Verwendung der jeweils spezifischen Primer Cxyfor und Cxyrev (Sequenzen siehe 2.2.4.) wurden in Standard-PCR-Ansätzen neben dem Fragment für C1s auch DNA-Stücke der erwarteten Größe für C1r, C2 und C4 detektiert (Abb. 3.18). Der Komplementfaktor C1q ließ sich in der cDNA-Bank 1 mit Hilfe der PCR-Technik nicht nachweisen.

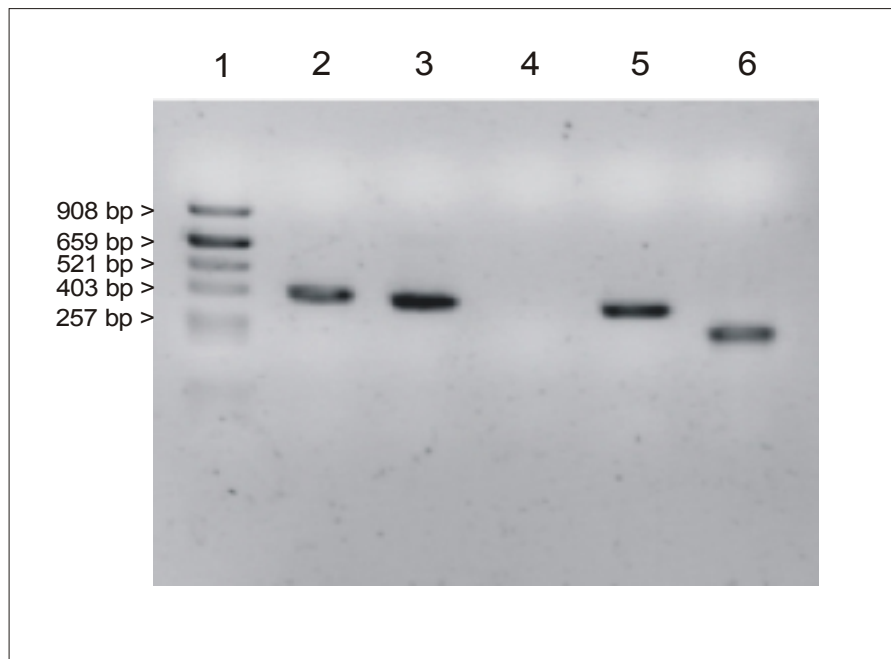


Abbildung 3.18: cDNA-Fragmente der Komplementfaktoren C1s, C1r, C2 und C4 als PCR-Produkte ausgehend von Plasmid-DNA der cDNA-Bank 1. 300ng Plasmid-DNA der cDNA-Bank 1 wurden als Template in einen Standard-PCR-Ansatz eingesetzt. Unter Verwendung spezifischer Primer wurden cDNA-Fragmente von C1s (382bp, Spur 2), C1r (360bp, Spur 3), C2 (340bp, Spur 5) und C4 (258bp, Spur 6) amplifiziert. Für den Faktor C1q wurde keine DNA der erwarteten Größe (Soll: 440bp) detektiert (Spur 4).

3. Ergebnisse

Die Sequenzierung dieser PCR-Produkte bestätigte, dass es sich hierbei um die erwarteten cDNA-Fragmente der Gene für C1s (Basen 373-754, *accession number* XM 006641), C1r (Basen 779-1138, *accession number* NM 001733), C2 (Basen 981-1320, *accession number* XM 004193) und C4 (Basen 475-732, *accession number* XM 004199) handelt.

3.2.3. Die mRNA der Komplementfaktoren ist nur in Praeadozyten nachweisbar, nicht in reifen Adipozyten

Um zu überprüfen, ob die Komplementfaktoren C1s, C1r, C2 und C4 in Praeadozyten und reifen Adipozyten gleichermaßen präsent sind, wurden entsprechende Zellysate mittels RT-PCR untersucht.

Nach Ernte konfluenter, primär kultivierter Stromazellen in NP40-Lysepuffer und Abzentrifugieren der Zellkerne wurde die in diesem Zellysat enthaltene Gesamt-RNA ohne weitere Aufreinigung unter Verwendung von Zufallshexameren revers transkribiert. Aliquots dieser RT-Ansätze wurden als Templates für anschließende PCR-Ansätze verwendet.

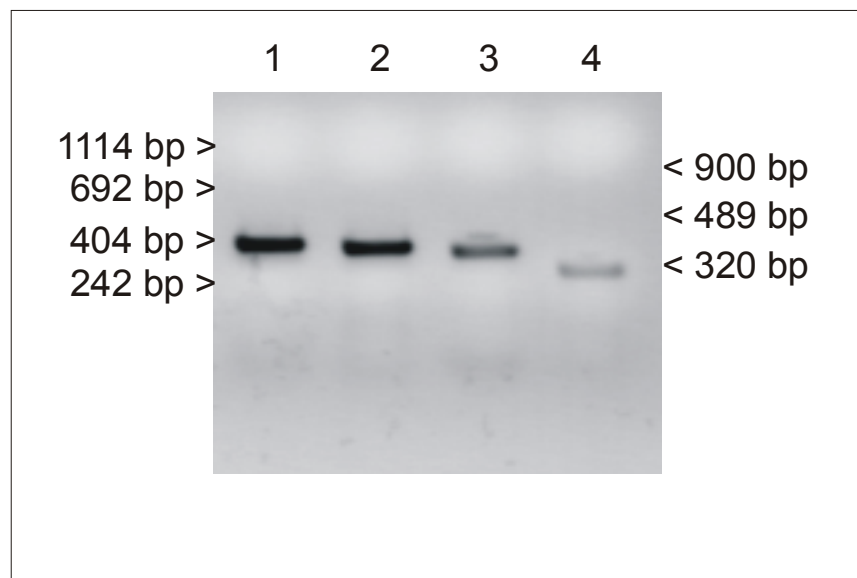


Abbildung 3.19: Nachweis der mRNA von C1s, C1r, C2 und C4 im Praeadozyten-Zellysat. Stromazellen aus humanem Fettgewebe wurden bis zur Konfluenz kultiviert. Nach schonender Lyse mit NP40-Lysepuffer, Abzentrifugieren der Zellkerne und Reverser Transkription der in diesem Zellysat enthaltenen Gesamt-RNA mit Zufallshexameren, wurden Aliquots dieses RT-Ansatzes unter Verwendung jeweils spezifischer Primer (siehe 2.2.4.) zur Amplifizierung von cDNA-Fragmenten der in der cDNA-Bank 1 nachgewiesenen Komplementfaktoren verwendet. Im 2%igen Agarose-Gel wurden cDNA-Fragmente der erwarteten Größe für C1s (382bp, Spur 1), C1r (360bp, Spur 2), C2 (340bp, Spur 3) und C4 (258bp, Spur 4) detektiert.

3. Ergebnisse

Alle vier in der cDNA-Bank 1 repräsentierten Komplementfaktoren wurden erwartungsgemäß in Zellysaten aus Praeadipozyten nachgewiesen. Während aber bei den Ansätzen von C1s und C1r für die Amplifizierung von im ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel sichtbaren cDNA-Mengen bereits 30 PCR-Zyklen ausreichten, waren für die Amplifizierung entsprechender Mengen an cDNA für C2 und C4 36 PCR-Zyklen notwendig, was auf unterschiedliche mRNA-Mengen im Zellysat hindeutete. Das gewünschte cDNA-Fragment für den Komplementfaktor C1q konnte auch mit dieser Methode nicht nachgewiesen werden (vgl. 3.2.2., nicht gezeigt).

Für einen RT-Ansatz geeignete Zellysate reifer Adipozyten wurden ebenfalls durch leichte Lyse mit NP40-Lysepuffer gewonnen (vgl. 2.6.9.3.1.). Nach Zentrifugation wurde das klare Zellysat für die Reverse Transkription verwendet.

Keiner der vier in humanen Praeadipozyten exprimierten Komplementfaktoren des klassischen Aktivierungsweges ließ sich hierbei nachweisen (Abb. 3.20).

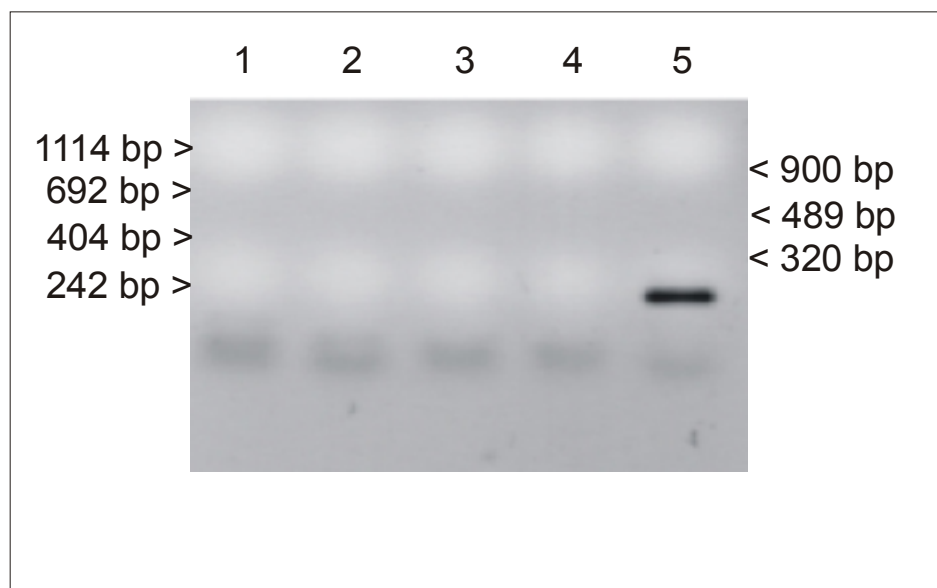


Abbildung 3.20: RT-PCRs zum Nachweis von C1s, C1r, C2 und C4 in reifen Adipozyten. Reife Adipozyten wurden nach dem Waschen mit 0,9%iger NaCl-Lösung mit NP40-Lysepuffer versetzt. Nach Zentrifugation wurde das klare Zellysat im RT-Ansatz verwendet. Aliquots dieses RT-Ansatzes wurden als Template in entsprechende PCR-Reaktionen eingesetzt. Die mRNA keines der Komplementfaktoren (C1s, Spur 1; C1r, Spur 2; C2, Spur 3; C4, Spur 4) konnte in reifen Adipozyten nachgewiesen werden. Als Kontrolle für die Effizienz der Reversen Trankription diente die Amplifizierung eines Fragmentes der 18S-rRNA unter Verwendung der Primer ribofor und riborev (Sequenzen siehe 2.2.4.) im folgenden PCR-Ansatz. Die Bande der erwarteten Größe (183bp) wurde im 2%igen Agarosegel detektiert (Spur 5).

3. Ergebnisse

3.2.4. Nachweis der Translation und Sekretion der Komplementfaktoren C1s und C1r in humanen Praeadipozyten

Nachdem die mRNA für die Komplementfaktoren C1s, C1r, C2 und C4 in primär kultivierten humanen Praeadipozyten nachgewiesen war, sollten Bedingungen für die Detektion der Proteine im Western-Blot etabliert werden. Dies gelang für die Faktoren C1s und C1r.

Der Komplementfaktor C1s konnte sowohl im Zellysat aus humanen Praeadipozyten als auch im zugehörigen Zellkulturüberstand detektiert werden (Abb. 3.21), im Western-Blot wurde eine Bande der erwarteten Größe (85kDa) erhalten.

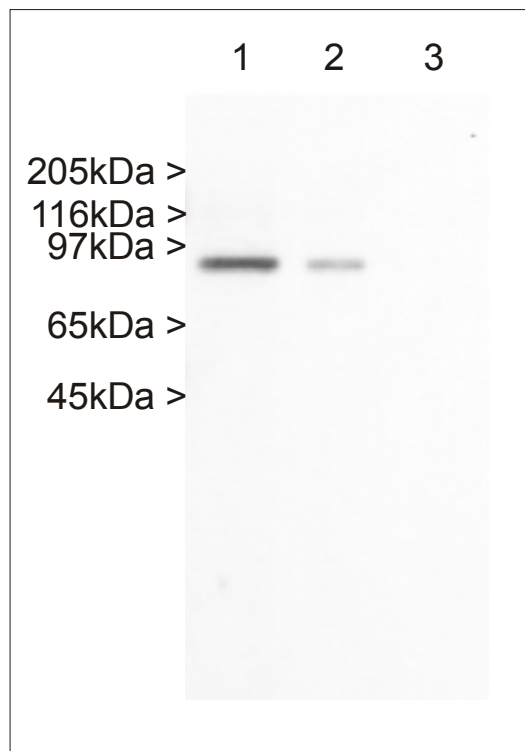


Abbildung 3.21: Nachweis des Komplementfaktors C1s durch Western-Blot. Stromazellen des humanen Fettgewebes wurden unter serumfreien Bedingungen bis zur Konfluenz kultiviert und weitere 48h in SD6-Medium gehalten, bevor der Zellkulturüberstand abgenommen, der Zellrasen mit Z1-Puffer gewaschen und in Z2-Puffer geerntet wurde. 20 μ l (0,01 VT) des Zellkulturüberstandes (Spur 1), 5 μ g Protein des Zellysates (Spur 2) und 20 μ l SD6-Medium als Negativ-Kontrolle (Spur 3) wurden unter nicht reduzierenden Bedingungen der SDS-PAGE (12,5%iges Gel) unterzogen und auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Die Immundetektion erfolgte wie unter 2.8.1. beschrieben. Sowohl im Zellkulturüberstand als auch im Zellysat wurde ein Protein der erwarteten Größe (85kDa) detektiert.

Die Detektion eines Proteins der richtigen Größe im Zellysat und der Nachweis des sezernierten Proteins im Zellkulturüberstand deuten auf die funktionelle Expression des Komplementfaktors C1s hin.

3. Ergebnisse

Auch der Komplementfaktor C1r konnte sowohl im Zellysat als auch im Zellkulturüberstand durch Western-Blot-Technik identifiziert werden (Abb. 3.22), es wurde ein Signal für ein Protein der erwarteten Größe (85kDa) erhalten.

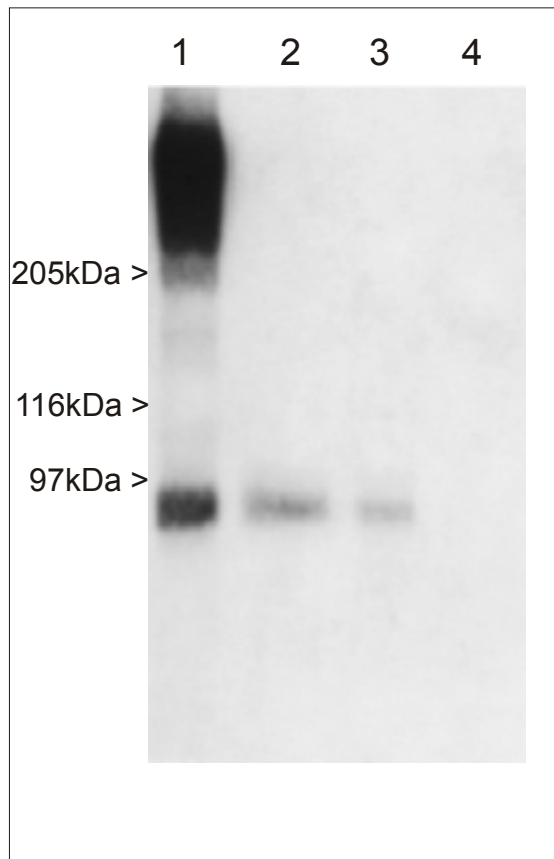


Abbildung 3.22: Nachweis des Komplementfaktors C1r im Western-Blot. Stromazellen des humanen Fettgewebes wurden unter serumfreien Bedingungen bis zur Konfluenz kultiviert und weitere 48h in SD6-Medium gehalten, bevor der Zellkulturüberstand abgenommen, der Zellrasen mit Z1-Puffer gewaschen und in Z2-Puffer geerntet wurde. 20 μ l (0,01 VT) des Zellkulturüberstandes (Spur 2), 5 μ g Protein des Zellysates (Spur3) und 20 μ l SD6-Medium als Negativ-Kontrolle (Spur 4) wurden unter nicht reduzierenden Bedingungen der SDS-PAGE (8%iges Gel) unterzogen. Als Positiv-Kontrolle dienten 10 μ l einer humanen Serumprobe (1:100 verdünnt in Z1-Puffer). Nach Transfer auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte die Immundetektion wie unter 2.8.1. beschrieben. Sowohl im Zellkulturüberstand als auch im Zellysat wurde ein Protein der erwarteten Größe (85kDa) detektiert.

Auch hier impliziert der Nachweis von C1r im Zellysat und im Zellkulturüberstand dessen funktionelle Expression.

Die Komplementfaktoren C2 und C4 konnten unabhängig von den geblotteten Proteinmengen, dem verwendeten Blockierungsmittel und der Konzentration des primären Antikörpers im Western-Blot weder im Zellkulturüberstand noch im Zellysat nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

3.2.5. Verifizierung der Expression von C1r, C1s, C2 und C4 in humanen Praeadipozyten

Obwohl die verwendeten Stromazellpräparationen mikroskopisch homogen waren und fast reine Praeadipozytenpräparationen darstellten, da sie unter entsprechenden Bedingungen faktisch vollständig zu Adipozyten differenzierten (nicht gezeigt), bestand dennoch die Möglichkeit, dass die Expression der nachgewiesenen Komplementfaktoren des klassischen Aktivierungsweges anderen Zelltypen, wie zum Beispiel Fibroblasten [1] als potentiellen Kontaminanten der Zellkulturen, zuzuordnen waren.

Um die Expression der Komplementfaktoren eindeutig den Praeadipozyten zuzuordnen, wurden zum einen serumfreie Zellkulturüberstände aus der Kultur von SGBS-Zellen, einer humanen Praeadipozyten-Zelllinie [115], hinsichtlich der Gegenwart von C1s bzw. C1r untersucht, zum anderen wurde versucht cDNA-Fragmente der einzelnen Komplementfaktoren ausgehend von Gesamt-RNA dieser Zelllinie durch RT-PCR-Ansätze zu erhalten.

Durch Western-Blot-Technik konnte bestätigt werden, dass auch in SD6-Zellkulturüberständen aus einer Kultur von SGBS-Zellen die beiden Faktoren C1s und C1r präsent sind, diese also tatsächlich von Praeadipozyten sezerniert werden (siehe Abb. 3.23).

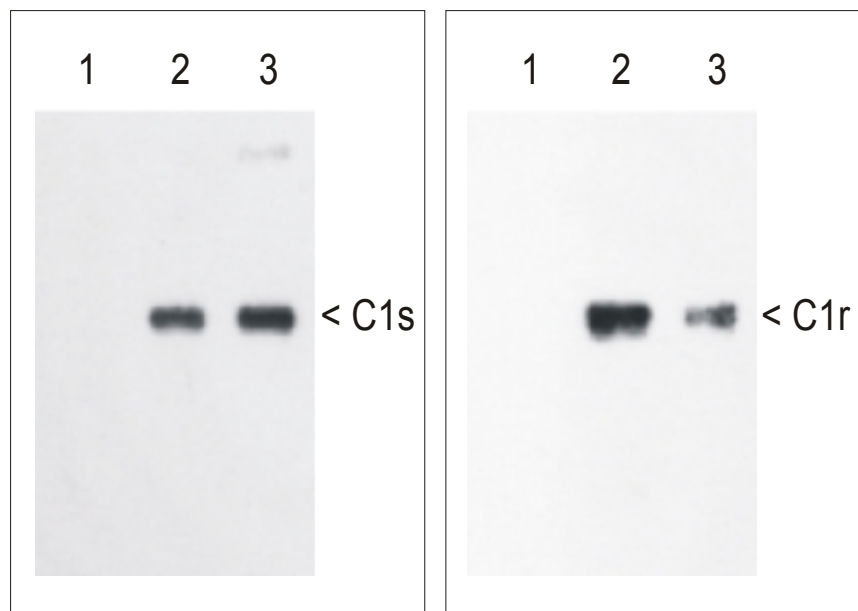


Abbildung 3.23: Nachweis von C1s und C1r in Überständen aus einer Kultur von SGBS-Zellen. 20µl SD6-Medium (Spuren 1), 20µl SD6-Zell-kulturüberstand [48h, konfluente SGBS-Zellen] (Spuren 2) und 20µl SD6-Zellkulturüberstand [48h, konfluente, primär kultivierte Praeadipozyten] (Spuren 3) wurden unter nicht reduzierenden Bedingungen der SDS-PAGE (8%iges Gel) unterzogen und per Elektroblob auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Immundetektion erfolgte gemäß 2.8.1. . Sowohl C1s als auch C1r konnten in den Überständen der Kultur der humanen Praeadipozyten-Zelllinie nachgewiesen werden.

3. Ergebnisse

Weiterhin wurde Gesamt-RNA aus konfluenten SGBS-Zellen isoliert und unter Verwendung von Zufallshexameren revers transkribiert. Diese RT-Ansätze wurden dann als Template in Standard-PCR-Ansätzen zur Amplifizierung der cDNA-Fragmente der einzelnen Komplementfaktoren verwendet.

Hierbei zeigte sich, dass die cDNA-Fragmente der vier in primär kultivierten Praeadipozyten nachgewiesenen Komplementfaktoren des klassischen Aktivierungsweges auch ausgehend von Gesamt-RNA aus SGBS-Zellen zu amplifizieren sind (Abb. 3.24).

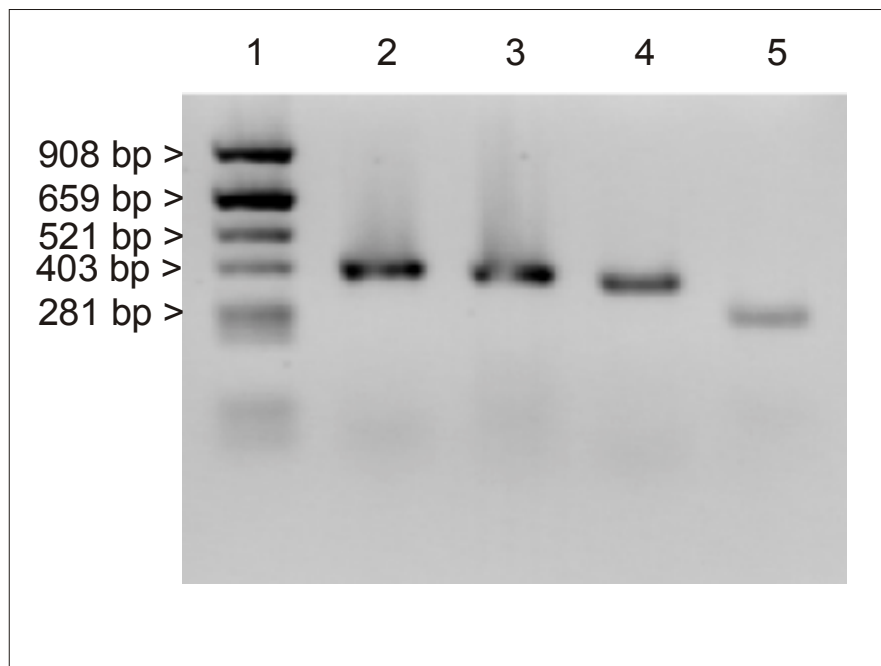


Abbildung 3.24: RT-PCR zum Nachweis von C1s, C1r, C2 und C4 in SGBS-Zellen. Je 5µg Gesamt-RNA wurden unter Verwendung von Zufallshexameren revers transkribiert und in Standard-PCR-Ansätzen unter Verwendung der jeweils spezifischen Primer Cxyfor und Cxyrev (siehe 2.2.4.) eingesetzt. Die amplifizierten cDNA-Fragmente der erwarteten Größe für C1s (382bp, Spur 1), C1r (360bp, Spur 2), C2 (340bp, Spur 3) und C4 (258bp, Spur 4) wurden im ethidiumbromid-gefärbten 2%igen Agarosegel detektiert. Spur 1: DNA-Standard pBR322Alul.

Auch bei diesen RT-PCR-Ansätzen zeigte sich, dass für die Amplifizierung von im ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel sichtbaren Mengen an PCR-Produkt für die Komplementfaktoren C2 und C4 höhere Zyklenzahlen (36 Zyklen) notwendig waren als für die Faktoren C1s und C1r (30 Zyklen, vgl. 3.2.3.).

3. Ergebnisse

3.2.6. Differenzierungsabhängige Expression der nachweisbaren Komplementfaktoren in humanen Praeadipozyten

3.2.6.1. Optimierung einer RT-PCR zum semiquantitativen Nachweis der Komplementfaktoren

Um die differenzierungsabhängige Expression der Komplementfaktoren C1s, C1r, C2 und C4 zu untersuchen, wurde eine semiquantitative RT-PCR etabliert, die ausgehend von RT-PCR von NP40-Zellysaten und anschließend Southern-Blot aufgrund der Intensitäten der detektierten Banden Aussagen über die relative Menge der entsprechenden mRNA zu einem bestimmten Zeitpunkt der Differenzierung zulassen sollte.

Vergleichbare Ergebnisse sollten zum einen durch den Bezug der Signalstärke einer jeden Kinetik auf eine quantitativ definierte Referenzbande erhalten werden (externer Standard), zum anderen diente die Intensität eines RT-PCR-Fragmentes der 18S-rRNA als Maß für die in die Reverse Transkription eingesetzte Gesamt-RNA-Menge (interner Standard).

Nachdem vorab die RT-PCR-Bedingungen für die einzelnen Faktoren so optimiert worden waren, dass auch bei relativ hohen Zyklenzahlen keine unspezifischen Banden im ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel sichtbar waren (nicht gezeigt), wurde mittels Zyklusabhängigkeit der PCR-Reaktionen die optimale Zyklenzahl für die jeweilige RT-PCR ermittelt (Abb. 3.25, Abb. 3.26).

Die PCR-Reaktionen wurden dabei als „Step-down“-PCR-Reaktionen durchgeführt, d. h. wenigen PCR-Zyklen mit hohen Annealing-Temperaturen (hohe Spezifität) folgen viele PCR-Zyklen mit niedrigerer Annealing-Temperatur (hohe Effizienz). Denaturierung und Elongation wurden bei 94°C bzw. bei 72°C durchgeführt und dauerten genau wie die Annealing-Phase jeweils 30s.

Als optimal für die Amplifizierung der jeweiligen cDNA-Fragmente erwiesen sich jeweils folgende Annealing-Temperaturen und Zyklenzahlen:

C1s, C1r:	3 Zyklen 54°C, 3 Zyklen 52°C, 17 Zyklen 51°C
C2, C4:	3 Zyklen 54°C, 3 Zyklen 52°C, 22 Zyklen 50°C
18S-rRNA:	3 Zyklen 54°C, 3 Zyklen 52°C, 9 Zyklen 50°C

Die Zyklenzahlen wurden dabei im linearen Bereich der Amplifizierung gewählt (siehe Abb. 3.20).

3. Ergebnisse

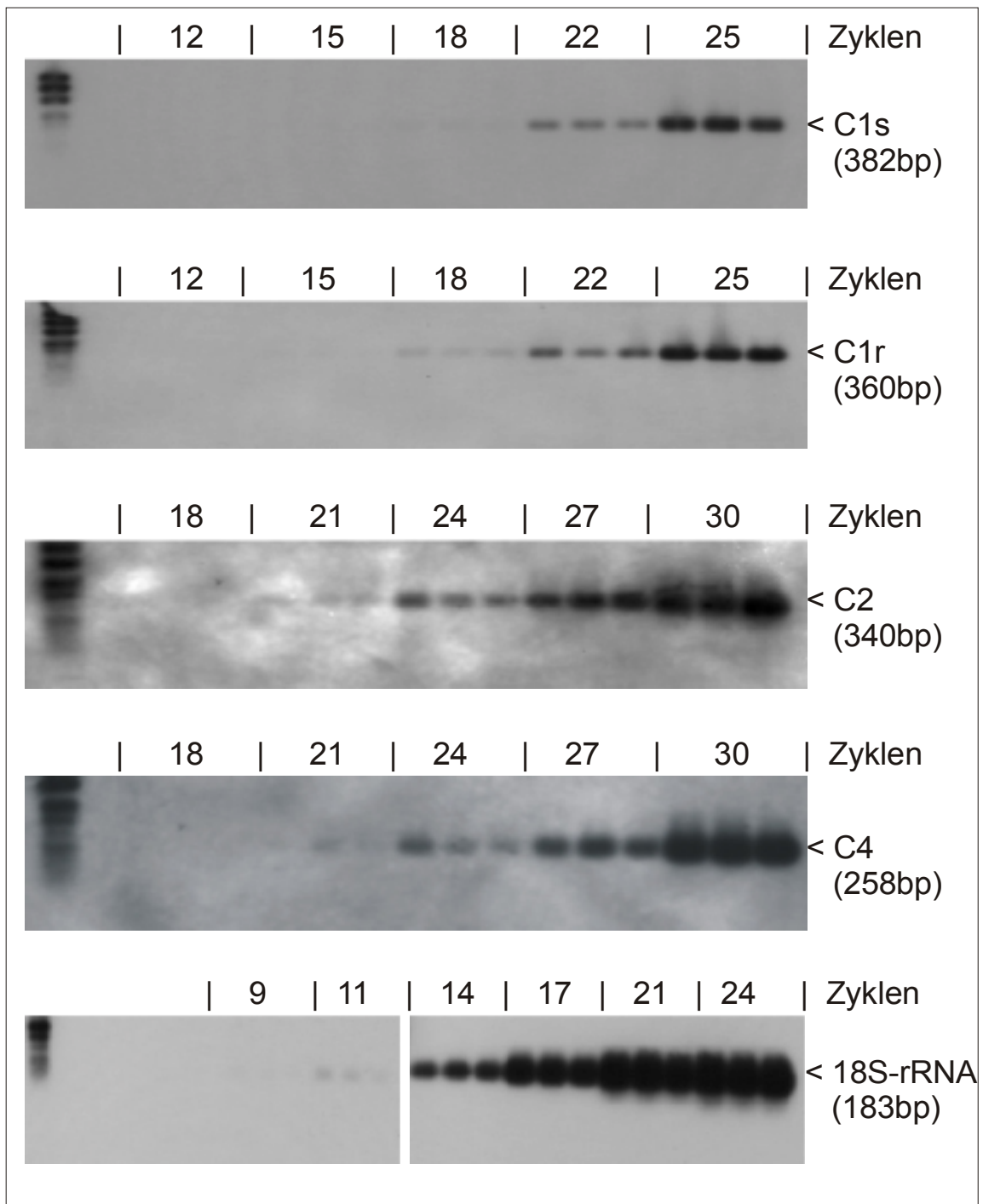


Abbildung 3.25: Detektion der cDNA-Fragmente von C1s, C1r, C2, C4 und 18S-rRNA im Southern-Blot. Ein PCR-Master-Mix zur Amplifizierung des jeweiligen Fragmentes mit einer repräsentativen Mischung von RT-Ansätzen als Template wurde auf Einzelansätze verteilt, die Reaktion gestartet und nach den angegebenen Zyklenzahlen jeweils drei PCR-Ansätze entnommen. Nach Elektrophorese im 2%igen Agarosegel und Kapillarblot erfolgte Hybridisierung mit jeweils spezifischen dig-markierten DNA-Sonden und Detektion gemäß 2.6.8. In der linken Spur wurde jeweils dig-markierter DNA-Standard VIII aufgetragen. Bestimmung der relativen Intensitäten der detektierten Banden siehe Abb. 3.26.

3. Ergebnisse

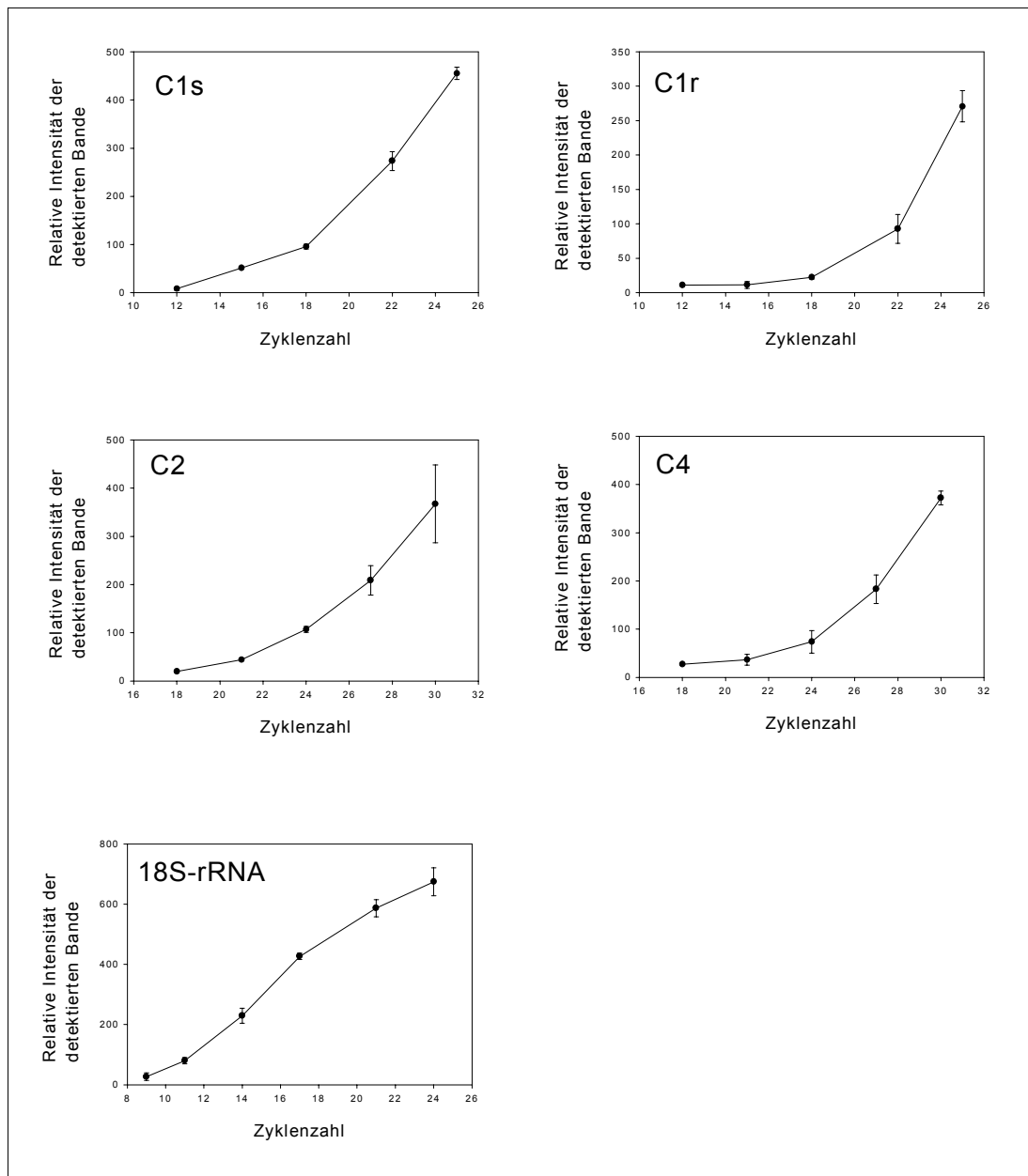


Abbildung 3.26: Zyklusabhängigkeit der RT-PCRs für die Fragmente C1s, C1r, C2, C4 und 18S-rRNA. Nach der densitometrischen Bestimmung der relativen Intensitäten der im Southern-Blot detektierten Banden (Abb. 3.25) wurden die Mittelwerte \pm SEM als Funktion der Zykluszahl dargestellt. Als geeignete Gesamt-Zykluszahl für die semiquantitative Amplifizierung der verschiedenen cDNA-Fragmente wurden gewählt: C1s: 23 Zyklen, C1r: 23 Zyklen, C2: 28 Zyklen, C4: 28 Zyklen, 18S-rRNA: 15 Zyklen.

3.2.6.2. Differenzierungsabhängige Expression der Komplementfaktoren C1s und C1r

3.2.6.2.1. Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCR

Zur Untersuchung der differenzierungsabhängigen Expression der Komplementfaktoren wurden humane Praeadipozyten unter serumfreien Bedingungen bis zur Konfluenz kultiviert (24-Well-Platte) und anschließend durch die Zusätze Cortisol (10^{-7} M) und IBMX (0,5mM) in SD6-Medium zur Differenzierung stimuliert, die Differenzierungszusätze entfielen ab Tag 8. Kontroll-Zellen wurden auf einer separaten 24-Well-Platte während der ganzen Dauer einer Kinetik in SD6-Medium gehalten. Jeden zweiten Tag wurden vor dem Medienwechsel je zwei Wells pro Platte aberntet, das eine in NP40-Lysepuffer zur Verwendung der Gesamt-RNA in einer Reversen Transkription und anschließender Verwendung dieses RT-Ansatzes in der entsprechenden semiquantitativen PCR, das andere in Z2-Puffer zur Bestimmung des Differenzierungsgrades über die Ermittlung der spezifischen GPDH-Aktivität (siehe 2.5.3.). Quantitative Aussagen über den Gehalt der entsprechenden mRNA zu einem bestimmten Zeitpunkt der Differenzierung wurden über die Intensität der durch Southern-Blot detektierten spezifischen cDNA möglich (vgl. 3.2.6.1.).

Durch diese semiquantitative RT-PCR konnte auf mRNA-Ebene ein Rückgang des Komplementfaktors C1s bis auf ein Viertel des Ausgangswertes (Tag 0, Start der Induktion) nachgewiesen werden (Abb. 3.27), wenn die Zellen mit Cortisol und IBMX zur Differenzierung angeregt wurden und der erwartete Anstieg der spezifischen GPDH-Aktivität während der Kinetik zu beobachten war (Abb. 3.27). In den während der Kinetik in SD6-Medium inkubierten Praeadipozyten fiel dieser Rückgang der C1s-mRNA genau wie der Anstieg der spezifischen GPDH-Aktivität geringer aus (Abb. 3.27).

Auch für den Komplementfaktor C1r konnte dieser Rückgang auf mRNA-Ebene während der Differenzierung beobachtet werden (Abb. 3.28). Im Vergleich zur C1s-mRNA fiel dieser hier noch etwas stärker aus, während in den Kontroll-Zellen ebenfalls nur eine leichte Abnahme der C1r-mRNA zu beobachten war (Abb. 3.28).

3. Ergebnisse

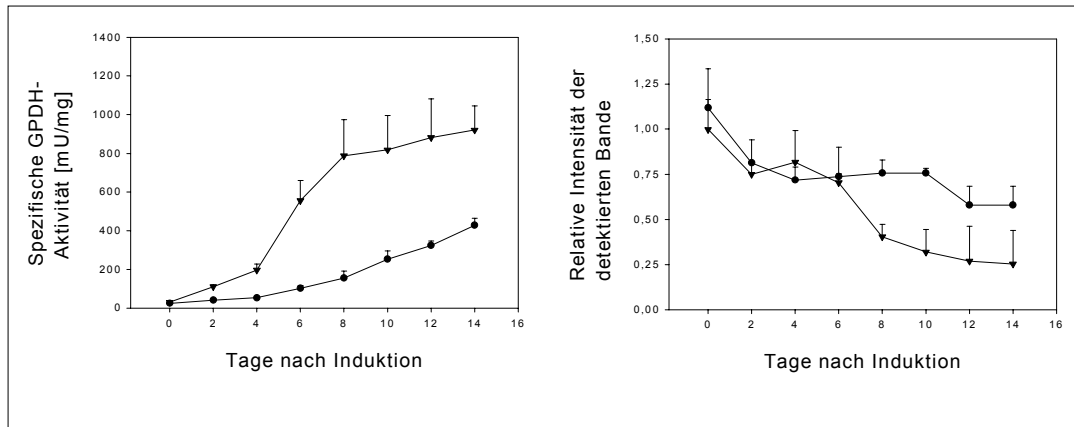


Abbildung 3.27: Semiquantitative RT-PCR zum Nachweis der C1s-mRNA während der Differenzierung von humanen Praeadipozyten. Humane Praeadipozyten wurden unter serumfreien Bedingungen bis zur Konfluenz kultiviert und durch Zusatz von Cortisol und IBMX zum SD6-Medium zur Differenzierung angeregt (▼), bzw. in SD6-Medium alleine (●) weiterinkubiert. Im Vergleich zu den in SD6-Medium gehaltenen Kontroll-Zellen zeichnete sich der differenzierte Ansatz durch den bekannten starken Anstieg der spezifischen GPDH-Aktivität während der adipogenen Konversion aus (Abb. links), gleichzeitig wurde in ihm ein Rückgang des Komplementfaktors C1s auf mRNA-Ebene (Abb. rechts) nachgewiesen. Dieser fiel im Vergleich zu den in SD6-Medium inkubierten Zellen stärker aus. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM aus drei Präparationen.

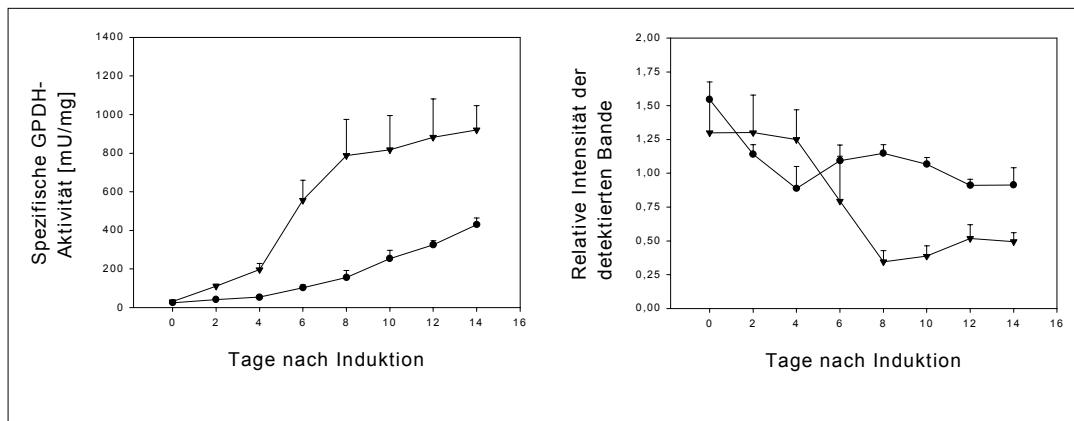


Abbildung 3.28: Semiquantitative RT-PCR zum Nachweis der C1r-mRNA während der Differenzierung von humanen Praeadipozyten. Humane Praeadipozyten wurden unter serumfreien Bedingungen bis zur Konfluenz kultiviert und durch Zusatz von Cortisol und IBMX zum SD6-Medium zur Differenzierung angeregt (▼), bzw. in SD6-Medium alleine (●) weiterinkubiert. Im Vergleich zu den in SD6-Medium gehaltenen Kontroll-Zellen zeichnete sich der differenzierte Ansatz durch den erwarteten starken Anstieg der spezifischen GPDH-Aktivität während der adipogenen Konversion aus (Abb. links), gleichzeitig wurde in ihm ein Rückgang des Komplementfaktors C1r auf mRNA-Ebene (Abb. rechts) nachgewiesen. Dieser Rückgang fiel im Vergleich zu den in SD6-Medium inkubierten Zellen stärker aus. Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM aus drei Präparationen.

3. Ergebnisse

3.2.6.2.2. Differenzierungsabhängiger Nachweis der Komplementfaktoren C1s und C1r durch Western-Blot-Technik

Um zu überprüfen, ob der durch semiquantitative RT-PCR auf mRNA-Ebene gezeigte Rückgang der Komplementfaktoren C1s und C1r während der Differenzierung von humanen Praeadiipozyten auch auf Proteinebene nachweisbar ist (vgl. 3.2.6.2.1.), wurden die beiden Proteine in Zellysaten zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung durch Western-Blot untersucht (Abb. 3.29).

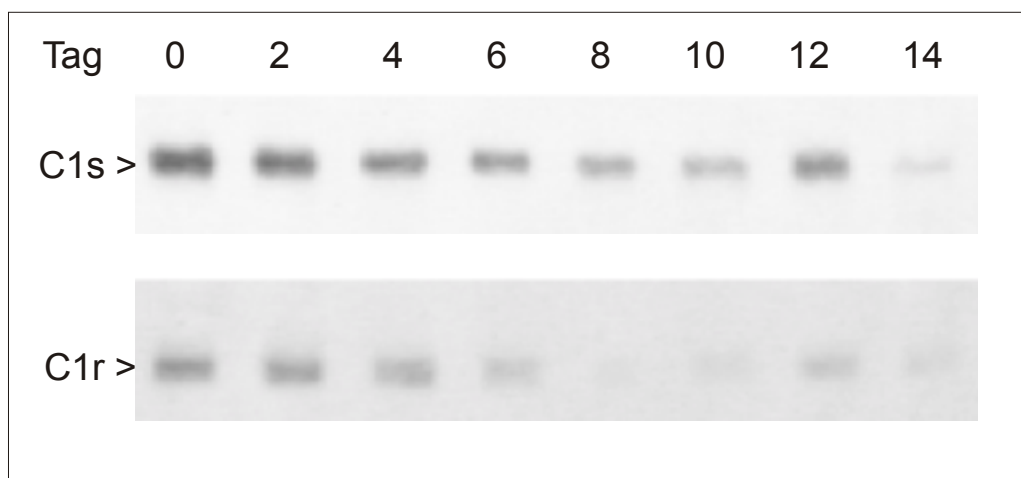


Abbildung 3.29: Detektion der Komplementfaktoren C1s und C1r in humanen Praeadiipozyten zu verschiedenen Zeitpunkten der Differenzierung. Stromazellen des humanen Fettgewebes wurden isoliert, serumfrei aufgezogen und gemäß Standardprotokoll (siehe 2.4.4.) mit Medienwechsel an jedem zweiten Tag zur Differenzierung gebracht. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen in Z2-Puffer geerntet (siehe 2.5.1.) und die spezifische GPDH-Aktivität bestimmt, bevor die Zellysate bis zum Ende der Kinetik bei -20°C aufbewahrt wurden. Jeweils $5\mu\text{g}$ Protein des Gesamtzellysates wurden der SDS-PAGE (8%iges Gel) unter nicht reduzierenden Bedingungen unterzogen, Western-Blotting und Immundetektion erfolgten gemäß 2.7.4. bzw. 2.8.1. .

Für beide im Western-Blot detektierbaren Komplementfaktoren konnte die erwartete, aus den differenzierungsabhängig abnehmenden mRNA-Level ableitbare, sinkende Expressionsrate bestätigt werden (Abb. 3.30). Ausgehend von Tag 0 sank bei dieser Zellkultur die Intensität der im Western-Blot detektierten Bande bis Tag 14 um den Faktor 7 (C1s) bzw. 3 (C1r), während die spezifische GPDH-Aktivität als Maß für den Differenzierungsgrad der Zellen im selben Zeitraum entsprechend anstieg (Abb. 3.30).

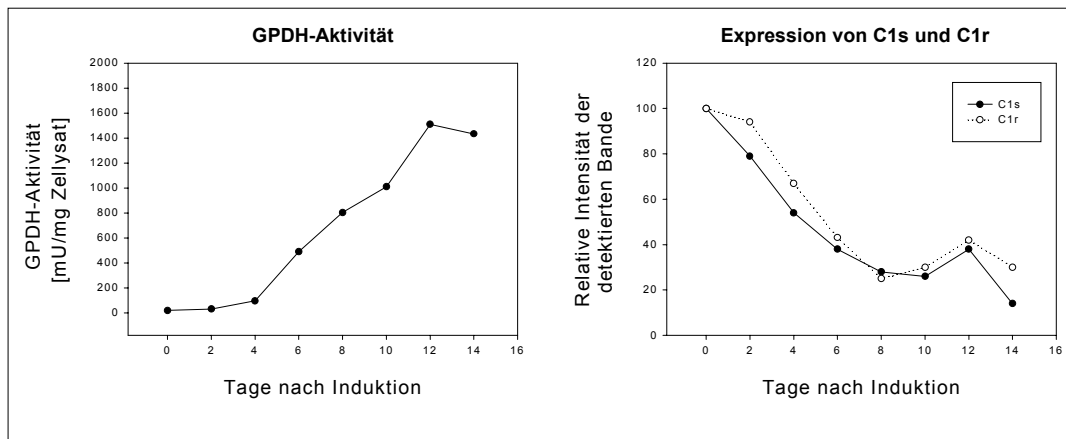


Abbildung 3.30: Spezifische GPDH-Aktivität einer Kultur differenzierender humaner Praeadipozyten und Abnahme der Expression von C1s und C1r während dieser Differenzierung. Dargestellt sind die für die Western-Blots aus Abb. 3.29 ermittelten Werte für die relativen Intensitäten der detektierten Banden und die ermittelten Werte für die spezifische GPDH-Aktivität als Indikator der adipogenen Konversion.

3.2.6.3. Differenzierungsabhängige Expression der Komplementfaktoren C2 und C4

Mit der semiquantitativen RT-PCR wurden die gleichen Zellpräparationen wie für C1s und C1r (vgl. 3.2.6.2.1.) auch hinsichtlich der differenzierungsabhängigen Expression der Komplementfaktoren C2 und C4 untersucht, wobei die hier erzielten Ergebnisse indifferent waren.

Für den Komplementfaktor C2 wurden zwar im Mittel niedrigere mRNA-Mengen in stärker differenzierten Ansätzen gefunden (Abb. 3.31), aus den Daten scheint auch ein Rückgang dieses Komplementfaktors auf mRNA-Ebene während der Differenzierung ableitbar, dieser fällt aber nicht so eindeutig aus wie für die Komplementfaktoren C2 und C4 (vgl. 3.2.6.2.1.) und bleibt wegen den stark streuenden Daten unsicher (Abb. 3.31).

Ein ähnliches Bild ergibt sich für die differenzierungsabhängige Expression des Komplementfaktors C4 (Abb. 3.32). Auch hier werden in Ansätzen mit höherer spezifischen GPDH-Aktivität zwar niedrigere C4-mRNA-Mengen nachgewiesen, ob die Expression von C4 differenzierungsabhängig sinkt, bleibt jedoch fraglich, zumal auch für den nicht differenzierten Ansatz fallende C4-mRNA-Mengen während der Kinetik detektiert wurden (Abb. 3.32).

3. Ergebnisse

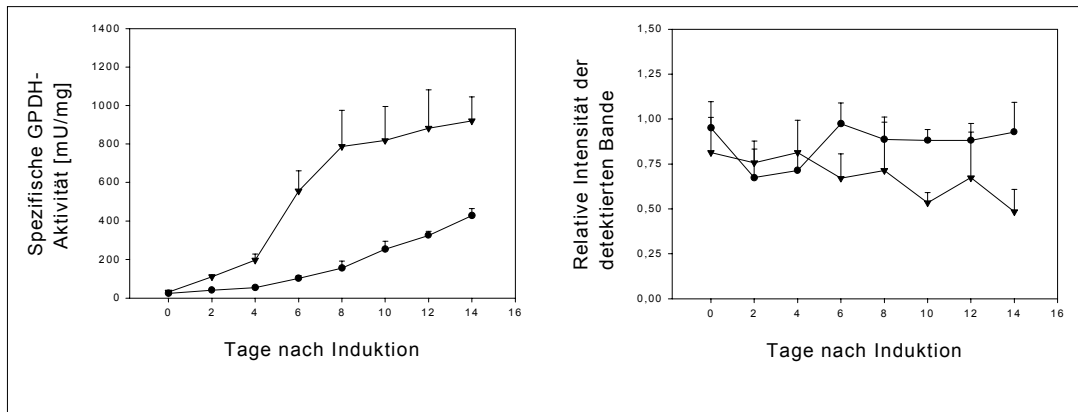


Abbildung 3.31: Semiquantitative RT-PCR zum Nachweis der C2-mRNA während der Differenzierung von humanen Praeadipozyten. Humane Praeadipozyten wurden unter serumfreien Bedingungen bis zur Konfluenz kultiviert und durch Zusatz von Cortisol und IBMX zum SD6-Medium zur Differenzierung angeregt (▼), bzw. in SD6-Medium alleine (●) weiterinkubiert. Im Vergleich zu den in SD6-Medium gehaltenen Kontroll-Zellen zeichnete sich der differenzierte Ansatz durch den erwarteten starken Anstieg der spezifischen GPDH-Aktivität während der adipogenen Konversion aus (Abb. links). In Ansätzen mit höheren spezifischen GPDH-Aktivitäten scheint die nachweisbare Menge an C2-mRNA niedriger zu sein (Abb. rechts). Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM aus drei Präparationen.

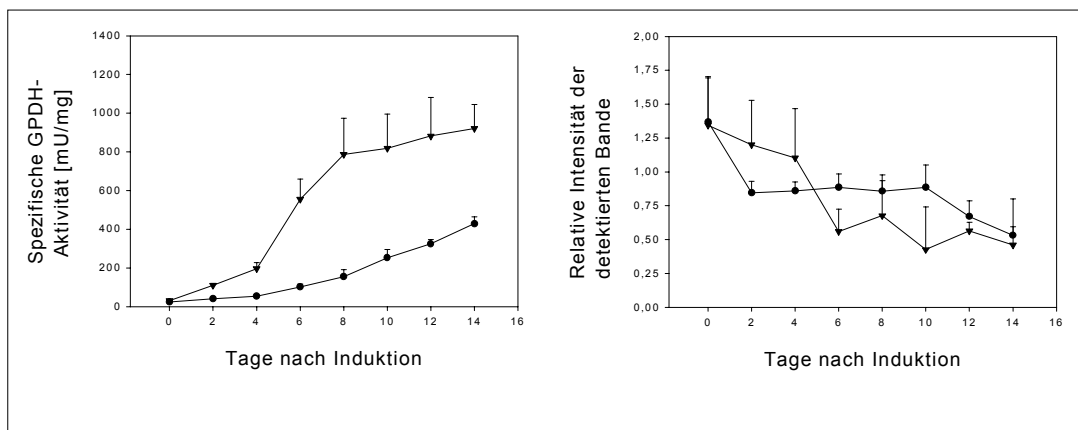


Abbildung 3.32: Semiquantitative RT-PCR zum Nachweis der C4-mRNA während der Differenzierung von humanen Praeadipozyten. Humane Praeadipozyten wurden unter serumfreien Bedingungen bis zur Konfluenz kultiviert und durch Zusatz von Cortisol und IBMX zum SD6-Medium zur Differenzierung angeregt (▼), bzw. in SD6-Medium alleine (●) weiterinkubiert. Im Vergleich zu den in SD6-Medium gehaltenen Kontroll-Zellen zeichnete sich der differenzierte Ansatz durch den erwarteten starken Anstieg der spezifischen GPDH-Aktivität während der adipogenen Konversion aus (Abb. links). Signifikante Unterschiede im Bezug auf die mRNA-Menge des Komplementfaktors C4 in verschieden stark differenzierten Praeadipozyten-Kulturen ergaben sich jedoch nicht (Abb. rechts). Gezeigt sind Mittelwerte \pm SEM aus drei Präparationen.

3. Ergebnisse

3.2.7. Einfluss äußerer Faktoren auf die Expression von C1s und C1r

3.2.7.1. Einfluss der Induktoren Cortisol und IBMX auf die Expression von C1s und C1r

Um nachzuweisen, dass die Abnahme der Expression von C1s und C1r tatsächlich mit der Differenzierung der Zellen einhergeht und nicht von einem der Zusätze im Differenzierungsmedium alleine induziert wird, wurden Zellkulturen humaner Praeadipozyten ab Tag 0 nur in SD6-Medium, in SD6-Medium mit Cortisol (10^{-7} M), in SD6-Medium mit IBMX (0,5mM) und in SD6-Medium mit beiden Zusätzen inkubiert. Nach Tag 8 erfolgte die Inkubation in SD6-Medium bis Tag14, an dem die Ansätze geerntet wurden.

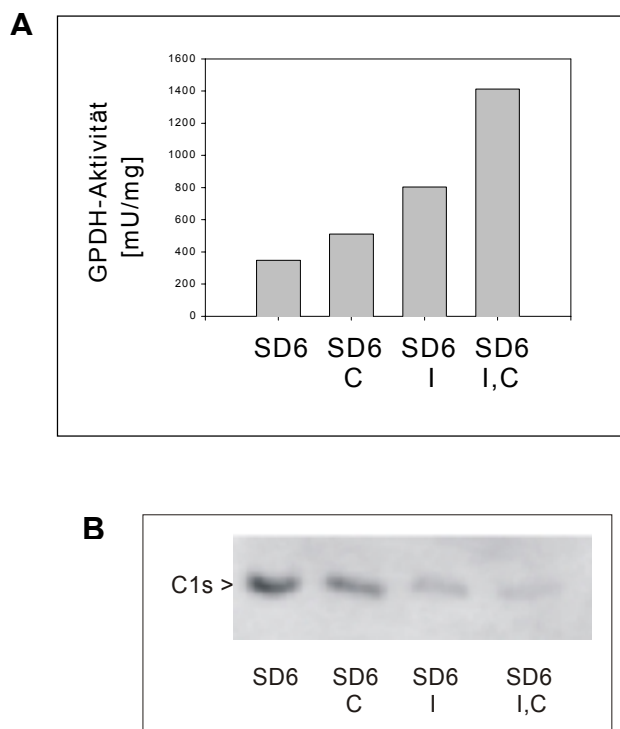


Abbildung 3.33: Expression von C1s bei Gegenwart verschiedener Differenzierungszusätze.

A) Die Anwesenheit verschiedener Differenzierungszusätze im Zellkulturmedium von Tag 0 bis Tag 8 spiegelt sich in entsprechenden Werten für die spezifische GPDH-Aktivität nach Ernte am Tag 14 wieder (C: 10^{-7} M Cortisol, I: 0,5mM IBMX).

B) 5µg Protein des Gesamtzelllysates aus den zugehörigen Zellkulturen wurden der SDS-PAGE (8%iges Gel) unter nicht reduzierenden Bedingungen unterzogen, die Immundetektion von C1s erfolgte gemäß 2.8.1. .

Die vier verschiedenen Zellkulturen zeigten die bekannten Unterschiede in ihrem Differenzierungsgrad und somit in ihrer spezifischen GPDH-Aktivität (Abb. 3.33). Praeadipozyten, die über die gesamte Dauer der Kultur in SD6-Medium gehalten wurden, differenzierten nicht. Der Zusatz von Cortisol bzw. IBMX hatte einen Anstieg der spezifischen GPDH-Aktivität zur Folge, wobei dieser bei IBMX höher ausfiel. Maximale Differenzierung wird bei gleichzeitiger Anwesenheit von Cortisol und IBMX im Zellkulturmedium bis Tag 8 erreicht.

Die Menge an detektiertem C1s und der Differenzierungsgrad der zugehörigen Zellkultur verhielten sich umgekehrt proportional zueinander (Abb. 3.33). Im maximal differenzierten

3. Ergebnisse

Ansatz mit Cortisol und IBMX als Induktoren wurde das Signal der geringsten Intensität detektiert, im Lysat der nur mit SD6-Medium behandelten und folglich undifferenzierten Praeadipozyten fand sich bei gleicher Gesamtproteinmenge die größte Menge an C1s. Für den Faktor C1r wurden analoge Verhältnisse gefunden (nicht gezeigt).

3.2.7.2. Einfluss von TNF α auf die Expression von C1s und C1r

Um zu untersuchen, ob sich die beschriebene dedifferenzierende Wirkung des Zytokins TNF α [116, 117] auf Adipozyten in einem erneuten Anstieg der Expressions- und Sekretionsraten für C1s und C1r niederschlägt, wurden primär kultivierte Praeadipozyten standardgemäß zur Differenzierung angeregt (vgl. 2.4.4.) und nach Medienwechsel am Tag 14 nach Induktion für 48h in SD6-Medium, das rekombinanten humanen TNF α in verschiedenen Konzentrationen enthielt, inkubiert. Anschließend wurden die Überstände abgenommen und die Zellen geerntet.

Die so behandelten Zellkulturen zeichneten sich durch einen dosisabhängigen Rückgang der spezifischen GPDH-Aktivität aus (Abb. 3.34, 3.35), die dedifferenzierende Wirkung von TNF α auf Adipozyten fand also Bestätigung.

Außerdem konnte durch Charakterisierung der Zellysate und der Zellkulturüberstände mit Western-Blot-Technik eine dosisabhängige Steigerung der Expressions- und der Sekretionsrate nach Applikation von hTNF α sowohl für C1s (Abb. 3.34) als auch für C1r (Abb. 3.35) beobachtet werden.

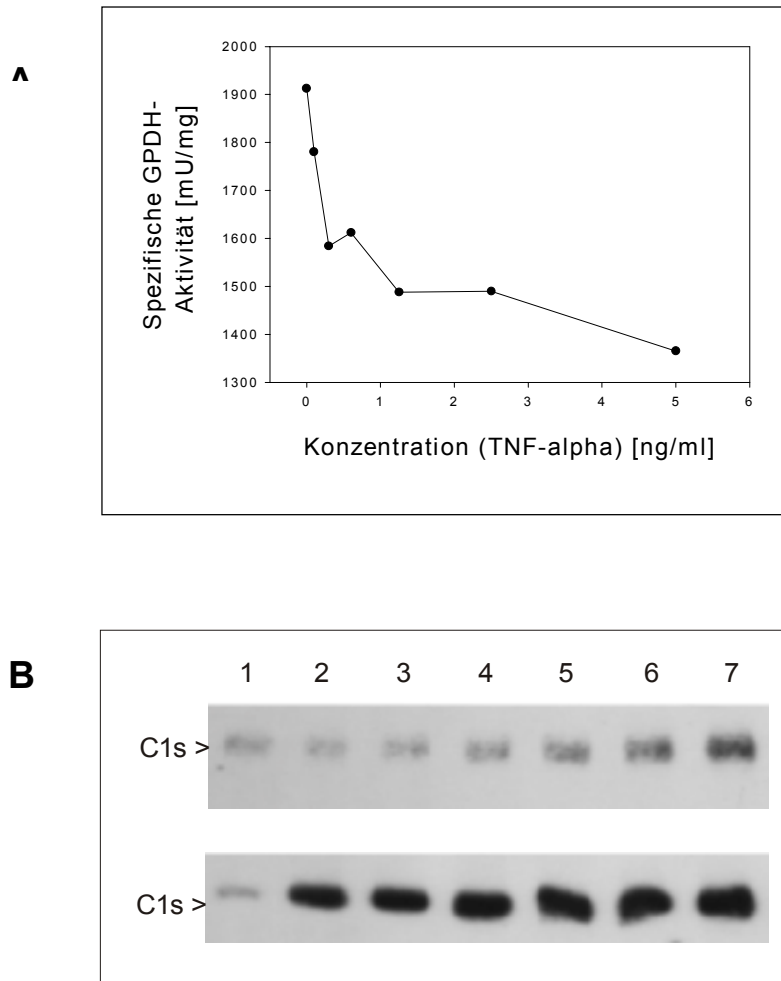


Abbildung 3.34: Steigerung der Expressions- und der Sekretionsrate des Komplementfaktors C1s in Adipozyten nach TNF α -Applikation. Nach 48stündiger Inkubation bis Tag 14 differenzierter Adipozyten mit SD6-Medium, dem verschiedene Konzentrationen an TNF α zugesetzt waren, war dessen dedifferenzierende Wirkung in dosisabhängig sinkenden Werten für die spezifische GPDH-Aktivität sichtbar (Abb. A). Dosisabhängig steigende Expressionsraten für C1s konnten durch Western-Blot-Analyse von 5 μ g Protein des Gesamtzelllysates (Abb. B, oben), steigende Sekretionsraten durch Western-Blot-Analyse gleichwertiger Volumina (20 μ l für c(TNF α) = 0, alle anderen Volumina wurden entsprechend der Proteinkonzentration des Zelllysates berechnet) der zugehörigen Zellkulturüberstände (Abb. B, unten) ermittelt werden. Die TNF α -Konzentrationen betragen (ausgehend von Spur 1) 0; 0,3; 0,6; 1,25; 2,5; 5 ng/ml Zellkulturmedium. Gezeigt sind die Resultate eines repräsentativen Experimentes.

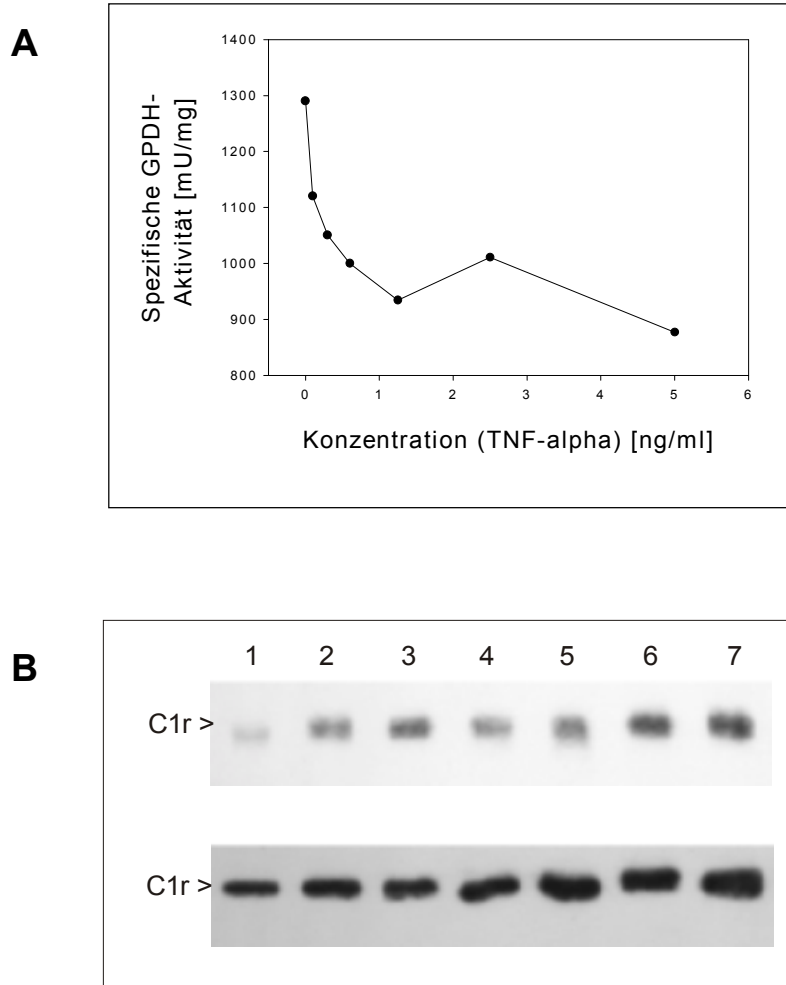


Abbildung 3.35: Steigerung der Expressions- und der Sekretionsrate des Komplementfaktors C1r in Adipozyten nach TNF α -Applikation. Nach 48stündiger Inkubation bis Tag 14 differenzierter Adipozyten mit SD6-Medium, dem verschiedene Konzentrationen an hTNF α zugesetzt waren, war dessen dedifferenzierende Wirkung in dosisabhängig sinkenden Werten für die spezifische GPDH-Aktivität sichtbar (Abb. A). Dosisabhängig steigende Expressionsraten für C1r konnten durch Western-Blot-Analyse von 5 μ g Protein des Gesamtzelllysates (Abb. B, oben), steigende Sekretionsraten durch Western-Blot-Analyse gleichwertiger Volumina (20 μ l für c(TNF α) = 0, alle anderen Volumina wurden entsprechend der Proteinkonzentration des Zelllysates berechnet) der zugehörigen Zellkulturüberstände (Abb. B, unten) ermittelt werden. Die TNF α -Konzentrationen betrugen (ausgehend von Spur 1) 0; 0,3; 0,6; 1,25; 2,5; 5 ng/ml Zellkulturmedium. Gezeigt sind die Resultate eines repräsentativen Experimentes.

4. Diskussion

4.1. Der Purinozeptor auf Stromazellen des humanen Fettgewebes

Die Tatsache, dass Zellen des Fettgewebes Adenosin-Rezeptoren (P1-Rezeptoren) differenzierungsabhängig exprimieren, ist seit längerem bekannt [118]. Der A₁-Rezeptor wird dabei ausschließlich in Adipozyten exprimiert, der A₂-Rezeptor in Praeadipozyten, wobei seine Expression mit der Differenzierung abnimmt [119]. Erste Hinweise darauf, dass unabhängig davon auf humanen Praeadipozyten ein weiterer Purinozeptor exprimiert sein muss, erlangte Martin Schmidt in seiner Dissertation [63]. ATP potenziert den Effekt von Cortisol und PDGF-BB bei der Induktion von Aromataseaktivität in Stromazellen des humanen Fettgewebes. Ausgehend von dieser Beobachtung konnte zum einen ausgeschlossen werden, dass dieser Effekt auf das Abbauprodukt des ATP, Adenosin, und Aktivierung entsprechender Adenosin-Rezeptoren zurückzuführen ist [63]. Zum anderen belegte die pharmakologische Klassifizierung des Rezeptors durch Reihung der Wirksamkeit verschiedener Agonisten im Aromataseinduktionstest die Existenz eines P2-Rezeptors, wobei diese am ehesten mit der für den P2X1-Rezeptor beschriebenen übereinstimmte. Johanna Dammeier isolierte in der Folgezeit ein cDNA-Fragment des humanen P2X1-Rezeptors aus Stromazellen des humanen Fettgewebes [71].

In dieser Arbeit sollte die weitere Charakterisierung dieses Purinozeptors vorangetrieben werden. Da die Agonistenpräferenz bei der Aromataseinduktion mit der Expression des nativen P2X1-Rezeptors alleine nicht zu erklären war, sollte das Screening einer cDNA-Bank aus humanen Praeadipozyten in einem Yeast-Two-Hybrid-Assay weiteren Aufschluss darüber geben, ob andere P2X-Rezeptoruntereinheiten auf Stromazellen des humanen Fettgewebes präsent sind.

Vorarbeiten für den Yeast-Two-Hybrid-Assay

Die Konstruktion des Bait-Plasmides für diesen Two-Hybrid-Assay gestaltete sich insofern schwierig, als die Isolierung des gesamten kodierenden Bereiches der cDNA für hP2X1 aus humanen Praeadipozyten nicht gelang (Abschnitt 3.1.1.). Es war ursprünglich beabsichtigt, das cDNA-Fragment, das für den gesamten extrazellulären Loop kodiert, für die Synthese des Fusionsproteins mit der DNA-Bindedomäne des Transkriptionsfaktors GAL4 zu verwenden. Weil zu diesem Zeitpunkt der Arbeit aber die Expression einer Splice-Variante des P2X1-Rezeptors auf Stromazellen des humanen Fettgewebes nicht ausgeschlossen werden konnte und Soto et al. [33] beispielsweise auf die Expression einer Splice-Variante des hP2X1 im Herzmuskel verwiesen, wobei hier ein Fragment des extrazellulären Loops fehlt, wurde auf weitere RT-PCR-Ansätze zur Isolierung der Vollängen-cDNA verzichtet und

4. Diskussion

das Fragment FEL des extrazellulären Loops als Bait-Protein verwendet (Abschnitt 3.1.1.). Dessen Bedeutung für die Wechselwirkung von P2X1 mit anderen Untereinheiten war bei der Ausbildung von stabilen Homotrimeren gezeigt worden [22].

Für Yeast-Two-Hybrid-Assays geeignete cDNA-Banken wurden ausgehend von polyA⁺-RNA aus humanen Praeadipozyten konstruiert (Abschnitt 3.1.2.) und in *E. coli* DH5α amplifiziert. Während sich bei der Charakterisierung dieser cDNA-Banken herausstellte, dass sich die Insert-DNA mit Größen zwischen 400bp und 1000bp für beide konstruierten cDNA-Banken im erwarteten Rahmen bewegte (Abschnitt 3.1.2.4.2.), wurde die Anzahl der unabhängigen Klone mit 400 000 für die cDNA-Bank 1 und 180 000 für die cDNA-Bank 2 bestimmt, wobei jeweils 80% dieser Klone Plasmid-DNA mit Inserts trugen (Abschnitt 3.1.2.4.1.). Qualitativ hochwertige cDNA-Banken für Two-Hybrid-Assays sollten ca. 10⁶ Klone enthalten [102], für Screenings noch am ehesten geeignet erschien demgemäß die cDNA-Bank 1. Der Grund für die geringe Anzahl unabhängiger Klone blieb unklar, mit der Qualität der eingesetzten mRNA (Abschnitt 3.1.2.2.) und der Effizienz von Erst- und Zweitstrangsynthese (nicht gezeigt) wurden wichtige Parameter bei der Konstruktion qualitativ guter cDNA-Banken kontrolliert, dennoch wurden nach Elektroporation von *E. coli* DH5α tendenziell immer zu wenig Klone erhalten.

Two-Hybrid-Screenings

Die cDNA-Bank 1 wurde im Bezug auf Proteine, die mit dem Fragment des extrazellulären Loops von hP2X1 (Aminosäuren K190 bis T331) wechselwirken, gescreent. Nach Cotransformation der Hefestämme Y190 bzw. CG-1945 mit dem Bait-Konstrukt und Plasmid-DNA aus der cDNA-Bank1, die für die Target-Proteine kodierte, sollte sich bei Interaktion von Bait- und Target-Protein ein GAL4-analoger Transkriptionsfaktor mit der entsprechenden Affinität zu einer GAL4-UAS ergeben und zur Transkription der so kontrollierten Reportergene *HIS3* und *lacZ* führen. Die Expression des Bait-Proteins, seine Nicht-Toxizität für die verwendeten Hefestämme und die Tatsache, dass seine Expression alleine die Reportergene nicht aktiviert, wurden gezeigt (Abschnitt 3.1.3.1.).

Bei den durchgeführten Screenings wurden Cotransformanten, die ohne Histidin wuchsen und demgemäß das *HIS3*-Protein exprimierten, in einem β-Galaktosidase-Assay auf die Aktivierung des zweiten Reportergens untersucht. Nur für den Klon K37/2 (Abschnitt 3.1.3.3.) wurde β-Galaktosidase-Aktivität detektiert, wie jedoch die Sequenzierung des isolierten Genbank-Plasmides zeigte, war dieser eindeutig als falsch positiv zu charakterisieren. Ein Fragment der cDNA des humanen Komplementfaktors C1s als Insert, das in der verkehrten Orientierung im Vektor pGAD10 enthalten war, führte zur Expression eines *nonsense*-

4. Diskussion

Proteins, nichtsdestotrotz war dies der erste Hinweis auf die Expression von Komplementfaktoren des klassischen Aktivierungsweges in humanen Praeadipozyten, die im zweiten Teil dieser Arbeit näher untersucht wurde.

Aus den durchgeführten Two-Hybrid-Assays ergaben sich demgemäß keine Hinweise darauf, dass der ATP-Effekt bei der Aromataseinduktion durch Cortisol und PDGF-BB von einem heteromeren P2X-Rezeptor vermittelt wird; dieser Befund bedarf jedoch einer differenzierten Betrachtung.

Zur Zeit sind vier heteromere P2X-Rezeptoren charakterisiert [29, 31, 28, 56], mit dem Heteromer aus P2X1- und P2X5-Rezeptoruntereinheiten befindet sich unter diesen auch ein Ionenkanal, zu dessen Funktionalität P2X1-Untereinheiten beitragen. Sein Ligandenprofil stimmt aber ebenfalls nicht mit dem des Ionenkanals auf Praeadipozyten überein [26, 28]. Torres et al. [32] konnten mit Hilfe spezieller Immunpräzipitationstechniken nachweisen, dass von den bekannten P2X-Rezeptoruntereinheiten neben P2X5 auch P2X2, P2X3 und P2X6 als Wechselwirkungspartner für P2X1 in Frage kommen.

Eine Ursache für die negativen Two-Hybrid-Screenings könnte darin liegen, dass das Bait-Plasmid pAS1-FEL nur für ein Segment des extrazellulären Loops der hP2X1-Rezeptoruntereinheit kodierte und somit nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Tertiärstruktur dieses Peptides nicht derjenigen im nativen Protein entspricht. Dass die als Bait verwendete Proteinsequenz in vivo nicht an der Wechselwirkung mit anderen Untereinheiten beteiligt ist, kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. Welche Proteinabschnitte an der Heterooligomerisierung von P2X-Rezeptoren beteiligt sind, ist noch nicht abschließend geklärt. Beide angeführten Ursachen für die negativen Two-Hybrid-Assays könnten zudem den Befund erklären, dass eine Sequenz für hP2X1 in der cDNA-Bank 1 nachgewiesen werden konnte (Abschnitt 3.1.2.4.3.), diese allerdings nicht in einem positiven Klon im Two-Hybrid-Assay resultierte, obwohl die Homooligomerisierung von hP2X1 nachgewiesen ist [32].

Die nicht optimale Qualität der für die Screenings verwendeten cDNA-Bank 1 lässt es nicht zu, generell die Existenz einer weiteren P2X-Untereinheit auf humanen Praeadipozyten auszuschließen und die Wirksamkeit der verschiedenen Agonisten bei der Induktion von Aromataseaktivität durch Cortisol und PDGF-BB der Aktivierung verschiedener, voneinander unabhängiger Purinozeptoren zuzuschreiben. Nur bei Verwendung einer cDNA-Bank mit entsprechend hoher Anzahl an unabhängigen Klonen hätten die negativen Ergebnisse der Two-Hybrid-Assays als Hinweis auf das Fehlen einer anderen Rezeptoruntereinheit interpretiert werden können. Gestützt wird diese Erklärung für den ATP-Effekt bei der Aromataseinduktion im übrigen von der Tatsache, dass die Applikation von Purinnukleotiden Calciumtransienten in Stromazellen des humanen Fettgewebes auslöst, wobei die dabei

4. Diskussion

mobilisierten Ca^{2+} -Ionen aus intrazellulären Depots zu stammen scheinen [63]. Dies könnte für die Expression eines G-Protein-gekoppelten P2Y-Rezeptors sprechen, der durch einen Two-Hybrid-Assay ausgehend von P2X1 nicht zu charakterisieren wäre. Dass solche Anordnungen in vivo verwirklicht sind, zeigt die Tatsache, dass der früher als Vertreter einer eigenen P2-Unterfamilie mit spezifischer Pharmakologie diskutierte P2T-Rezeptor der Thrombozyten [16] inzwischen in drei voneinander unabhängige P2-Rezeptoren aufgelöst werden konnte [120]. Die parallele Aktivierung von P2Y1 (G-Protein gekoppelt), P2X1 (ligandgesteuerter Ionenkanal) und P2T(AC) [132] (wirkt über die Regulation der Adenylatcyclase) führt hier zur Ausbildung des übergeordneten Ligandenprofils.

Isolierung des fehlenden cDNA-Fragmentes für hP2X1

Nach den fehlgeschlagenen Two-Hybrid-Screenings erbrachten erneute RT-PCR-Ansätze ausgehend von mRNA aus humanen Praeadipozyten die Sequenzinformation über das fehlende Fragment der hP2X1-cDNA (Abschnitt 3.1.4.), diese wurde über den gesamten kodierenden Bereich nachgewiesen. Die Vermittlung des ATP-Effektes durch einen homomeren Ionenkanal aus Splicing-Varianten von hP2X1 ist somit auszuschließen. Die generelle Abwesenheit einer Splicing-Variante des humanen P2X1-Rezeptors folgt aus dem Nachweis des gesamten kodierenden Bereiches der hP2X1-cDNA jedoch nicht zwingend. Townsend-Nicholson et al. [36] konnten zeigen, dass für die murinen P2X4-Rezeptor-untereinheiten zwei Varianten existieren und die Coexpression dieser beiden Proteine in *Xenopus* Oocyten in einem funktionellen, heteromeren Rezeptor mit charakteristischen elektrophysiologischen Eigenschaften resultiert. Ein analoges Erklärungsmodell für den P2X-Rezeptor humaner Praeadipozyten kann deswegen nicht definitiv ausgeschlossen werden, Hinweise auf die Existenz einer P2X1-Variante in Stromazellen des humanen Fettgewebes, etwa durch Detektion mehrerer Banden im Southern-Blot erfolgreicher PCR-Ansätze nach Hybridisierung mit P2X1-spezifischen DNA-Sonden wurden nicht erhalten.

4.2. Expression von Komplementfaktoren des klassischen Aktivierungsweges in humanen Praeadozyten

Die Isolierung eines cDNA-Fragmentes, das für einen Teil des Komplementfaktors C1s kodierte (vgl. 3.1.3.3.), aus einer cDNA-Bank aus humanen Praeadozyten war Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen, die die Expression von Komplementfaktoren des klassischen Aktivierungsweges in humanen Praeadozyten zum Gegenstand hatten.

Nachweis der Expression von Komplementfaktoren des klassischen Aktivierungsweges in humanen Praeadozyten

Um die Expression des Komplementfaktors C1s in humanen Praeadozyten zu bestätigen, wurde die mRNA durch Northern-Blot-Technik nachgewiesen (Abschnitt 3.2.1.). Das Transkript der erwarteten Größe von 2,9kb war in 0,5µg polyA⁺-RNA aus humanen Praeadozyten nachzuweisen, sodass von einer funktionellen Expression von C1s ausgegangen werden kann.

Der Komplementfaktor C1s als Serinprotease des klassischen Aktivierungsweges, der nach seiner Aktivierung durch C1r im C1-Komplex die Proteine C4 und C2 spaltet und so an der Bildung der C3- und C5-Konvertase des klassischen Aktivierungsweges beteiligt ist [76], wird in verschiedenen Zelltypen zusammen mit anderen Komponenten dieser Reaktionskaskade exprimiert und sezerniert, so zum Beispiel in Monocyten/Makrophagen [72], Fibroblasten [121], Gliomzellen [122], Myoblasten [123] und Zellen des Herzmuskels [124].

Wie durch Screening der cDNA-Bank 1 aus humanen Praeadozyten durch PCR-Technik gezeigt werden konnte (Abschnitt 3.2.2.), sind in dieser zusammen mit der C1s-cDNA auch cDNA-Fragmente für die Komplementfaktoren C1r, C2 und C4 enthalten, der Faktor C1q konnte nicht nachgewiesen werden.

Die Tatsache, dass der Komplementfaktor C1q nicht in der cDNA-Bank 1 repräsentiert war, fand Bestätigung beim Übergang zur RT-PCR-Technik mit Gesamt-RNA aus humanen Praeadozyten (Abschnitt 3.2.3.) und lag demgemäß nicht in der Qualität der verwendeten Genbank begründet. cDNA-Fragmente der erwarteten Größe konnten ausgehend von Gesamt-RNA für die Komplementfaktoren C1s, C1r, C2 und C4 aus humanen Praeadozytenkulturen isoliert werden. Die Zahl der für die entsprechenden Amplifizierungsreaktionen notwendigen PCR-Zyklen waren hierbei jedoch unterschiedlich, zur Isolierung gleicher Mengen an cDNA aus der RT-PCR bedurfte es bei den Faktoren C2 und C4 höherer Zyklenzahlen als bei den Faktoren C1s und C1r, was auf entsprechend niedrigere Transkriptionsraten schließen lässt.

Expression von Komplementfaktoren des klassischen Aktivierungsweges in reifen Adipozyten

In reifen Adipozyten konnte durch RT-PCR-Technik keiner der in den Praeadipozyten präsenten Komplementfaktoren des klassischen Aktivierungsweges nachgewiesen werden (Abschnitt 3.2.3.). Die univakuolären Adipozyten des weißen Fettgewebes zeichnen sich durch ihr niedriges spezifisches Gewicht aus [2] und können unter Ausnutzung dieser Eigenschaft als saubere, homogene Zellpopulation gewonnen werden (vgl. 2.4.1.), sodass die Ergebnisse dieser RT-PCR-Experimente von hoher Aussagekraft waren und bereits darauf hindeuteten, dass die Synthese von Komplementfaktoren des klassischen Aktivierungsweges eine Eigenschaft der fibroblastenartigen Praeadipozyten ist, die sie während ihrer Differenzierung in Adipozyten verlieren.

Nachweis der Translation und Sekretion von Komplementfaktoren des klassischen Aktivierungsweges in humanen Praeadipozyten

Die Translation und Sekretion der Komplementfaktoren C1s und C1r in humanen Praeadipozyten konnte durch Western-Blot-Technik bestätigt werden (Abschnitt 3.2.4.). Mit dem Nachweis der beiden sezernierten Proteine im Zellkulturüberstand, wo sie gemäß ihrer physiologischen Bedeutung lokalisiert sind [125], scheint ihre Funktionalität wahrscheinlich. Auffällig in diesem Zusammenhang war, dass mit C1s und C1r die beiden Faktoren auf Proteinebene nachweisbar waren, die für ihre koordinierte Expression bekannt sind [72], die Etablierung von Western-Blot-Bedingungen für den Nachweis der Proteine C2 und C4 im Zelllysatz bzw. im Zellkulturüberstand dagegen erfolglos blieben (nicht gezeigt). Dieser Befund könnte mit der schwächeren Expression bzw. geringeren Sekretion dieser beiden Komplementfaktoren erklärt werden, worauf auch die im Vergleich zu C1s und C1r notwendigen höheren PCR-Zyklenzahlen der RT-PCR-Ansätze für die Isolierung der cDNA-Fragmente von C2 und C4 hindeuten.

Verifizierung der Expression von C1s, C1r, C2 und C4 in humanen Praeadipozyten

Obwohl bei der Präparation von Stromazellen des humanen Fettgewebes (vgl. Abschnitt 2.4.) äußerst exakt vorgegangen wurde und die verwendeten Praeadipozyten-Primärkulturen unter dem Mikroskop homogen erschienen, konnte die Gegenwart von kontaminierenden Zelltypen, die die nachgewiesenen Komplementfaktoren exprimieren, nicht ausgeschlossen werden [1]. Vor allem Fibroblasten [121] und Endothelzellen [72] waren hier als potentielle Expressionsorte möglich.

Durch Untersuchung von SGBS-Zellen konnte die Expression der Komplementfaktoren eindeutig den Praeadipozyten zugeordnet werden. Bei SGBS-Zellen handelt es sich um eine humane Praeadipozyten-Zelllinie [115], die aus dem subkutanen Fettgewebe eines Kindes

4. Diskussion

mit Simpson-Golabi-Behmel-Syndrom (SGBS) isoliert worden ist. SGBS-Zellen können zur adipogenen Konversion stimuliert werden, wobei während der Differenzierung adipozytenspezifische Gene angeschaltet werden und SGBS-Adipozyten morphologisch und funktionell mit Adipozyten aus der Primärkultur humaner Praeadipozyten übereinstimmen [115].

Zum einen wurden in Zellkulturüberständen aus der Kultur von SGBS-Zellen durch Western-Blot-Technik die Komplementfaktoren C1s und C1r nachgewiesen. Zum anderen konnten ausgehend von Gesamt-RNA aus SGBS-Zellen durch RT-PCR-Technik cDNA-Fragmente für die Komplementfaktoren C1s, C1r, C2 und C4 isoliert werden (Abschnitt 3.2.5.). Da hierbei außerdem auch zu beobachten war, dass für die Amplifizierung gleicher cDNA-Mengen verglichen mit C1s und C1r für die Komplementfaktoren C2 und C4 entsprechend höhere PCR-Zyklenzahlen notwendig waren, erscheinen primärkultivierte Praeadipozyten zur Untersuchung der differenzierungsabhängigen Expression der nachgewiesenen Komplementfaktoren durchaus geeignet.

Die semiquantitative RT-PCR zum Nachweis der differenzierungsabhängigen Expression der Komplementfaktoren

Um die differenzierungsabhängige Expression der Komplementfaktoren untersuchen zu können, wurden entsprechende semiquantitative RT-PCRs mit anschließendem Southern-Blot etabliert, die Änderungen der Expressionsrate der jeweiligen Komplementfaktoren während der Differenzierung auf mRNA-Ebene sichtbar machen sollten (Abschnitt 3.2.6.1.). Die Zyklenzahlen wurden aus den Zyklusabhängigkeiten der einzelnen PCR-Reaktionen ermittelt und wurden im linearen Bereich der Amplifizierungsreaktion gewählt. Die verwendete semiquantitative RT-PCR ist eine schnelle und relativ empfindliche Methode zur Untersuchung der Genexpression der in humanen Praeadipozyten nachgewiesenen Komplementfaktoren, wobei sie durch die geringen Mengen an notwendigem Ausgangsmaterial besticht.

Differenzierungsabhängige Expression der Komplementfaktoren C1s, C1r, C2 und C4 in humanen Praeadipozyten

Bei den Untersuchungen zur differenzierungsabhängigen Expression der in Praeadipozyten nachweisbaren Komplementfaktoren fand die bekannte Wirkung von Cortisol und IBMX bei der Induktion der adipogenen Konversion in Gegenwart von supraphysiologischen Insulinkonzentrationen Bestätigung (Abschnitt 3.2.6.). Während sich konfluente Praeadipozyten, die 14 Tage in SD6-Medium inkubiert wurden, durch eine relativ geringe Spontandifferenzierung auszeichneten und die spezifische GPDH-Aktivität Werte von ca. 400mU/mg annahm, wurden Praeadipozyten in serumfreier Kultur durch achttägige Applikation von

4. Diskussion

Cortisol und IBMX zur Differenzierung zu Adipozyten angeregt. Die spezifische GPDH-Aktivität als Maß für den Differenzierungsgrad der Zellen erreicht dabei Werte bis zu 1000mU/mg, sodass das verwendete Zellkultursystem zur Untersuchung der differenzierungsabhängigen Expression von Komplementfaktoren in humanen Praeadipozyten geeignet war.

Bei der Differenzierung von humanen Praeadipozyten wurde mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR für den Komplementfaktor C1s ein Rückgang auf mRNA-Ebene nachgewiesen (Abschnitt 3.2.6.2.1.), wobei dieser Rückgang auf ein Viertel der zum Induktionsstart detektierten mRNA-Menge deutlich stärker ausfiel als in nichtdifferenzierten Zellen. Auch für den Komplementfaktor C1r wurde während der Differenzierung eine Abnahme der nachweisbaren mRNA ermittelt (Abschnitt 3.2.6.2.1.). Dieser Rückgang der Genexpression für die Komplementfaktoren C1s und C1r konnte dadurch bestätigt werden, dass sowohl für C1s als auch für C1r durch Western-Blot-Technik während der Differenzierung in entsprechenden Zellysaten umso weniger Protein präsent war, je höher der Differenzierungsgrad der Zellkultur war (Abschnitt 3.2.6.2.2.). Diese Befunde fügten sich insofern in das Gesamtbild, als durch RT-PCR-Technik bereits gezeigt war, dass in reifen Adipozyten die Gene für C1s und C1r nicht exprimiert sind (Abschnitt 3.2.3.).

Dass die Abnahme der Expression von C1s und C1r differenzierungsabhängig erfolgt und nicht durch Applikation eines der beiden Differenzierungszusätze, Cortisol bzw. IBMX, alleine induziert wird, konnte durch die Untersuchung entsprechend behandelter Zellkulturen gezeigt werden (Abschnitt 3.2.7.1.). Durch Western-Blot-Technik wurde nachgewiesen, dass die im Zellysat nachweisbare Menge an C1s ausschließlich vom Differenzierungsgrad der zugehörigen Kultur abhängt. Die Induktion der adipogenen Konversion durch Cortisol, durch IBMX und durch Kombination dieser beiden Induktoren schlägt sich zwar in unterschiedlichen Werten für die spezifische GPDH-Aktivität am Tag14 nieder, ist aber bedeutungslos für die nachweisbaren Mengen an C1s und C1r, d.h. in Ansätzen mit höherer spezifischer GPDH-Aktivität werden die geringeren Mengen der Komplementfaktoren detektiert.

Die Ergebnisse zur Untersuchung der Expression von C2 und C4 während der Differenzierung waren nicht eindeutig. Für den Komplementfaktor C2 wurden im Mittel zwar geringere Expressionsraten im differenzierten Ansatz detektiert (Abschnitt 3.2.6.3.), eine signifikante Tendenz für den Verlauf der Expression während der Differenzierung konnte jedoch nicht abgeleitet werden. Für den Komplementfaktor C4 wurde eine relativ deutliche Abnahme der Transkriptionsrate während der Differenzierung ermittelt, auffällig hierbei war jedoch, dass sich diese auch im Kontroll-Ansatz mit dem sehr viel geringeren

4. Diskussion

Differenzierungsgrad zu ergeben schien (Abschnitt 3.2.6.3.). Diese Resultate stehen im Widerspruch zu der Tatsache, dass sich eine Genexpression für C2 und C4 in reifen Adipozyten durch RT-PCR-Technik nicht nachweisen ließ (Abschnitt 3.2.3.), könnten aber in den notwendigerweise relativ hohen PCR-Zyklenzahlen der entsprechenden semiquantitativen RT-PCR und den damit einhergehenden größeren Fehlern begründet liegen (Abschnitt 3.2.6.1.).

Einfluss von TNF α auf die Expression von C1s und C1r

Während die Applikation des Zytokins TNF α nur sehr geringen Einfluss auf die Expressions- und Sekretionsrate von C1s und C1r in humanen Praeadipozyten hatte (nicht gezeigt), ergaben sich bei der Gabe von TNF α auf differenzierte Adipozyten dosisabhängig deutliche Steigerungsraten für die Expression von C1s und C1r (Abschnitt 3.2.7.2.). Die starke Zunahme der Expression und der sezernierten Mengen beider Komplementfaktoren kann durch den dedifferenzierenden Effekt von TNF α auf Adipozyten, der sich in der Down-regulierung der Transkriptionsfaktoren PPAR- γ [116] und C/EBPs [117] niederschlägt und demgemäß auch in der dosisabhängigen Abnahme der spezifischen GPDH-Aktivität bei 48stündiger Inkubationszeit sichtbar wird, erklärt werden. Die Induktion der Expression von C1s und C1r durch TNF α in differenzierten Praeadipozyten kann nach der Verifizierung ihrer Expression in SGBS-Zellen (Abschnitt 3.2.5.) als weiterer Hinweis auf die Spezifität ihrer Expression in Praeadipozyten gelten.

Gesamtinterpretation der Resultate

Humane Praeadipozyten synthetisieren Komplementfaktoren des klassischen Aktivierungsweges. Während die Komplementfaktoren C2 und C4 durch RT-PCR-Technik nur auf mRNA-Ebene nachweisbar sind, können die Serinproteasen C1s und C1r durch Western-Blot-Technik sowohl im Zellysat als auch im Zellkulturüberstand auf Proteinebene nachgewiesen werden. Eine gewebespezifische Bedeutung der Expression dieser Faktoren, wie sie für Zellen des humanen Herzens nachgewiesen ist [124], wo die Faktoren nach Myokardinfarkt verstärkt exprimiert und aktiviert werden, für das Fettgewebe abzuleiten, erscheint fraglich, zumal die Expression des Komplementfaktors C1q in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden konnte und die Proteine der gemeinsamen Endstrecke im Fettgewebe nicht exprimiert werden [126]. Ob die Sekretion von apM1, einem fettgewebsspezifischen Protein mit Homologien zum Komplementfaktor C1q und bis heute unbekannter Funktion in diesem Zusammenhang zu verstehen ist, bedarf weiterer Untersuchungen, erscheint aber insofern unwahrscheinlich, als dieses Protein während der Differenzierung von Praeadipozyten verstärkt exprimiert und sezerniert wird [127].

4. Diskussion

Die Genexpression der nachweisbaren Komplementfaktoren scheint bei der Differenzierung von Praeadipozyten herunterreguliert zu werden. Darauf deutet zum einen die Tatsache hin, dass sie durch RT-PCR-Technik in reifen Adipozyten nicht mehr nachweisbar sind, zum anderen ergeben sich entsprechende Evidenzen aus den Untersuchungen zur differenzierungsabhängigen Expression mittels semiquantitativer RT-PCR-Technik.

Die Fettzellendifferenzierung, als deren physiologische Auslöser u.a. Insulin, Glukokortikoide und Wachstumsfaktoren identifiziert sind [9], ist als genetisches Programm zu verstehen, bei dessen Ablauf im Praeadipozyten nicht mehr benötigte Gene abgeschaltet werden und zahlreiche adipozytenspezifische Genprodukte neu gebildet werden [128]. Während die Komplementfaktoren des alternativen Aktivierungsweges zu den Sekretionsprodukten des reifen Adipozyten gehören [97], scheint die Expression der nachweisbaren Komplementfaktoren des klassischen Aktivierungsweges während der Differenzierung unterdrückt zu werden. Gestützt wird diese These durch den ausgeprägten Effekt von TNF α auf die Expression der Komplementfaktoren C1s und C1r in Kulturen differenzierter Praeadipozyten.

5. Zusammenfassung

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stehen mit den humanen Praeadipozyten die fibroblastenartigen Vorläuferzellen reifer Adipozyten. In diesen Praeadipozyten ist mit der Aromatase (Cytochrom P-450_{Arom}) das Schlüsselenzym der Estrogenbiosynthese lokalisiert. Das Fettgewebe wird für Männer und postmenopausale Frauen zur Hauptquelle zirkulierender Estrogene [13], wobei ihre Synthese mit dem Alter und steigender Körperfettmasse zunimmt [131]. Martin Schmidt konnte in seiner Dissertation [63] zeigen, dass ATP den Effekt von Cortisol und PDGF-BB bei der Aromataseinduktion in humanen Praeadipozyten potenziert und erhielt Hinweise auf die Beteiligung eines P2X-Rezeptors an der Vermittlung dieses Effektes [14].

Zur weiteren Charakterisierung dieses Purinozeptors wurde ein cDNA-Fragment des in humanen Praeadipozyten exprimierten P2X1-Rezeptors [71] isoliert. Ein Segment des extrazellulären Loops dieses Rezeptors wurde als "Bait" in einem Yeast-Two-Hybrid-Assay verwendet und eine cDNA-Bank, die ausgehend von polyA⁺-RNA aus humanen Praeadipozyten konstruiert worden war, nach weiteren Rezeptoruntereinheiten gescreent. Dabei ergaben sich keine Hinweise auf die Existenz von Proteinen, die mit diesem extrazellulären Segment wechselwirken.

Die cDNA für diesen P2X1-Rezeptor wurde über den gesamten kodierenden Bereich durch RT-PCR-Technik aus humanen Praeadipozyten isoliert, sodass ausgeschlossen werden kann, dass das vom Ligandenprofil des nativen P2X1-Rezeptors abweichende des Purinozeptors auf Praeadipozyten in der Existenz eines homomeren Ionenkanals aus einer Splice-Variante begründet liegt.

Unabhängig hiervon wurden humane Praeadipozyten als Expressionsort von Komplementfaktoren des klassischen Aktivierungsweges identifiziert. Die Faktoren C1s, C1r, C2 und C4 konnten auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden, während der Komplementfaktor C1q nicht gefunden wurde.

Die Serinproteasen C1s und C1r konnten zudem durch Western-Blot-Technik sowohl im Zellysat als auch in sezernierter Form im zugehörigen Zellkulturüberstand nachgewiesen werden, was ihre funktionelle Expression nahelegt.

Verifiziert wurden diese Befunde durch Untersuchungen an SGBS-Zellen, einer humanen Praeadipozytenlinie.

5. Zusammenfassung

Zur Untersuchung der differenzierungsabhängigen Expression der in humanen Praeadipozyten nachweisbaren Komplementfaktoren wurden semiquantitative RT-PCRs etabliert. Die Resultate belegen einen deutlichen Rückgang der Genexpression der Komplementfaktoren C1s und C1r während der Differenzierung primärkultivierter humaner Praeadipozyten, der bei der Untersuchung von entsprechenden Zellysaten durch Western-Blot-Technik Bestätigung findet.

Durch Western-Blot-Technik konnte zudem gezeigt werden, dass sich der dedifferenzierende Effekt von $\text{TNF}\alpha$ auf reife Adipozyten in einer Steigerung der Expressions- und Sekretionsrate für die Komplementfaktoren C1s und C1r niederschlägt.

Die Befunde des zweiten Teiles der Arbeit weisen nach den Adipozyten als Syntheseort der Komplementfaktoren des alternativen Aktivierungsweges [94] auch deren Vorläuferzellen als Expressionsort von Komplementfaktoren aus, wobei hier mit Ausnahme von C1q diejenigen des klassischen Aktivierungsweges synthetisiert werden. Während aber mit der Bildung von ASP für die Sekretionsprodukte der Adipozyten bereits eine gewebespezifische Funktion gefunden ist, bedarf es hierbei für die in Praeadipozyten exprimierten Komplementfaktoren weiterer Untersuchungen, für die in dieser Arbeit die Grundlagen gelegt wurden.

6. Literaturverzeichnis

1. Ailhaud, G., P. Grimaldi und R. Negrel. 1992. Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Ann. Rev. Nutr.* 12:207-233.
2. Jequier, E. und L. Tappy. 1999. Regulation of body weight in humans. *Physiol. Rev.* 79:451-480.
3. Trayhurn, P. 1996. Uncoupling protein in brown adipose tissue: molecular differentiation of the adipose tissues. *Biochem. Soc. Trans.* 24:402-406.
4. Mohamed-Ali, V., J. H. Pinkney und S. W. Coppack. 1998. Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. *Int. J. Obes.* 22:1145-1158.
5. Kern, P. A., M. Saghizadeh, J. M. Ong, R. J. Bosch, R. Deem und R. B. Simsolo. 1995. The expression of tumor necrosis factor in human adipose tissue. Regulation by obesity, weight loss, and relationship to lipoprotein lipase. *J. Clin. Invest.* 95:2111-2119.
6. Maslowska, M., T. Scantlebury, R. Germinario und K. Cianflone. 1997. Acute in vitro production of acylation stimulating protein in differentiated human adipocytes. *J. Lipid. Res.* 38:1-11.
7. Schling, P., H. Mallow, A. Trindl und G. Löffler. 1999. Evidence for a local renin angiotensin system in primary cultured human preadipocytes. *Int. J. Obes.* 23:336-341.
8. Friedman, J. M. und J. L. Halaas. 1998. Leptin and the regulation of body weight in mammals. *Nature* 395:763-770.
9. Daig, R., H. Staiger und G. Löffler. 1999. Pathophysiologie des Fettgewebes. *Ernährungs-Umschau* 46:208-214.
10. Wirth, A. . 1997. Adipositas. Epidemiologie, Ätiologie, Folgekrankheiten, Therapie. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
11. Schricker, K. . 1989. Östrogenproduktion in Fettgewebszellen. Dissertation (Universität Regensburg).
12. Ackerman, G.E., M. E. Smith, C. R. Mendelson, P. C. MacDonald und E. R. Simpson. 1981. Aromatization of androstenedione by human adipose tissue stromal cells in monolayer culture. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 53:412-417.
13. MacDonald, P. C., C. D. Edman, D. L. Hemsell, J. C. Porter und P. K. Siiteri. 1978. Effect of obesity on conversion of plasma androstenedione to estrone in postmenopausal women with and without endometrial cancer. *Am J. Obstet. Gynecol.* 130:448-455.
14. Schmidt, M. und G. Löffler. 1998. Induction of aromatase activity in human adipose tissue stromal cells by extracellular nucleotides. *Eur. J. Biochem.* 252:147-154.
15. Drury, A.N. und A. Szent-Gyorgyi. 1929. The physiological activity of adenine compounds with special reference to their action upon mammalian heart. *J. Physiol. Lond.* 68:213-237.
16. Dubyak, G. R. und C. El-Moatassim. 1993. Signal transduction via P₂-purinergic receptors for extracellular ATP and other nucleotides. *Am J. Physiol.* 265:C577-C606.
17. Whittaker, V. P. .1982. The synaptic vesicle. *Handb. Neurochem.* 7:41-69.

6. Literaturverzeichnis

18. Evans, R. J., V. Derkach und A. Surprenant. 1992. ATP mediates fast synaptic transmission in mammalian neurons. *Nature* 357:503-505.
19. Clemens, M. G. und T. Forrester. 1981. Appearance of adenosine triphosphate in the coronary sinus effluent from isolated working rat heart in response to hypoxia. *J. Physiol. Lond.* 312:143-158.
20. Gordon, J. L. . 1986. Extracellular ATP: effects, sources and fate. *Biochem. J.* 233:309-319.
21. Buell, G., G. Collo und F. Rassendren. 1996. P2X receptors: an emerging channel family. *Eur. J. Neurosci.* 8:2221-2228.
22. Nicke, A., H. G. Bäumert, J. Rettinger, A. Eichele, G. Lambrecht, E. Mutschler und G. Schmalzing. 1998. P2X₁ and P2X₃ receptors form stable trimers: a novel structural motif of ligand-gated ion channels. *EMBO J.* 17:3016-3028.
23. Burnstock, G. 1996. A unifying purinergic hypothesis for the initiation of pain. *The Lancet.* 347:1604-1605.
24. Tatham, P. E. R. und M. Lindau. 1990. ATP-induced pore formation in the plasma membrane of rat peritoneal mast cells. *J. Gen. Physiol.* 95:459-476.
25. Surprenant, A., F. Rassendren, E. Kawashima, R. A. North und G. Buell. 1996. The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X₇). *Science* 272:735-738.
26. Haines, W. R., G. E. Torres, M. M. Voigt und T. M. Egan. 1999. Properties of the novel ATP-gated ionotropic receptor composed of the P2X₁ and P2X₅ isoforms. *Mol. Pharmacol.* 56:720-727.
27. Le, K.-T., E. Boue-Grabot, V. Archambault und P. Seguela. 1999. Functional and biochemical evidence for heteromeric ATP-gated channels composed of P2X₁ and P2X₅ subunits. *J. Biol. Chem.* 274:15415-15419.
28. Torres, G. E., W. R. Haines, T. M. Egan und M. M. Voigt. 1998. Co-expression of P2X₁ und P2X₅ receptor subunits reveals a novel ATP-gated ion channel. *Mol. Pharmacol.* 54:989-993.
29. Lewis C., S. Neidhart, C. Holy, R. A. North, G. Buell und A. Surprenant. 1995. Coexpression of P2X₂ and P2X₃ receptor subunits can account for ATP-gated currents in sensory neurons. *Nature* 377:432-435.
30. North, R. A. und A. Surprenant. 2000. Pharmacology of cloned P2X receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40:563-580.
31. King, B. F., A. Townsend-Nicholson, S. S. Wildman, T. Thomas, K. M. Spyer und G. Burnstock. 2000. Coexpression of rat P2X₂ and P2X₆ subunits in *Xenopus* oocytes. *J. Neurosci.* 20:4871-4877.
32. Torres, G. E. , T. M. Egan und M. M. Voigt. 1999. Hetero-oligomeric assembly of P2X receptor subunits. *J. Biol. Chem.* 274:6653-6659.
33. Soto, F., M. Garcia-Guzman und W. Stühmer. 1997. Cloned ligand-gated channels activated by extracellular ATP (P2X receptors). *J. Membr. Biol.* 160:91-100.

6. Literaturverzeichnis

34. Lynch K. J. , E. Touma, W. Niforatos, K. L. Kage, E. C. Burgard, T. van Biesen, E. E. Kowaluk und M. F. Jarvis. 1999. Molecular and functional characterization of human P2X₂ receptors. *Mol. Pharmacol.* 56:1171-1181.
35. Dhulipala, P. D. K., Y.-X. Wang und M. I. Kotlikoff. 1998. The human P2X₄ receptor gene is alternatively spliced. *Gene* 207:259-266.
36. Townsend-Nicholson, A., B. F. King, S. S. Wildman und G. Burnstock. 1999. Molecular cloning, functional characterization and possible cooperativity between the murine P2X₄ and P2X_{4a} receptors. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 64:246-254.
37. Garcia-Guzman, M., W. Stühmer und F. Soto. 1997. Molecular characterization and pharmacological properties of the human P2X₃ purinoceptor. *Mol. Brain Res.* 47:59-66.
38. Valera, S., F. Talabot, R. J. Evans, A. Gos, S. E. Antonarakis, M. A. Morris und G. N. Buell. 1995. Characterization and chromosomal localization of a human P2X receptor from the urinary bladder. *Recep. Channels* 3:283-289.
39. Garcia-Guzman, M., F. Soto, J. M. Gomez-Hernandez, P. E. Lund und W. Stühmer. 1997. Characterization of recombinant human P2X₄ receptor reveals pharmacological differences to the rat homologue. *Mol. Pharmacol.* 51:109-118.
40. Buell, G. N., F. Talabot, A. Gos, J. Lorenz, E. Lai, M. A. Morris und S. E. Antonarakis. 1998. Gene structure and chromosomal localization of the human P2X₇ receptor. *Recep. channels* 5:347-354.
41. Fine, J., P. Cole und J. S. Davidson. 1989. Extracellular nucleotides stimulate receptor-mediated calcium mobilization and inositol phosphate production in human fibroblasts. *Biochem. J.* 263:371-376.
42. Valera, S., N. Hussy, R. J. Evans, N. Adami, R. A. North, A. Surprenant und G. Buell. 1994. A new class of ligand-gated ion channel defined by P_{2x} receptor for extracellular ATP. *Nature* 371:516-519.
43. Brake, A. J., M. J. Wagenbach und D. Julius. 1994. New structural motif for ligand-gated ion channels defined by an ionotropic ATP receptor. *Nature.* 371:519-523.
44. Chen, C-C., A. N. Akopian, L. Sivilotti, d. Colquhoun, G. Burnstock und J. N. Wood. 1995. A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. *Nature* 377:428-431.
45. Bo, X., Y. Zhang, M. Nassar, G. Burnstock und R. Schoepfer. 1995. A P2X purinoceptor cDNA conferring a novel pharmacological profile. *FEBS Lett.* 375:129-133.
46. Garcia-Guzman, M., F. Soto, B. Laube und W. Stühmer. 1996. Molecular cloning and functional expression of a novel rat heart P2X purinoceptor. *FEBS Lett.* 388:123-127.
47. Collo, G., R. A. North, E. Kawashima, E. Merlo-Pich, S. Neidhart, A. Surprenant und G. Buell. 1996. Cloning of P2X₅ and p2X₆ receptors and the distribution and properties of an extended family of ATP-gated ion channels. *J. Neurosci.* 16:2495-2507.
48. Le, K. T., M. Paquet, D. Nouel, K. Babinski und P. Seguela. 1997. Primary structure and expression of a naturally truncated human P2X ATP receptor subunit from brain and immune system. *FEBS Lett.* 418:195-199.

6. Literaturverzeichnis

49. Rassendren, F., G. N. Buell, C. Virginio, R. A. North und A. Surprenant. 1997. The permeabilizing ATP receptor, P2X₇. Cloning and expression of a human cDNA. *J. Biol. Chem.* 272:5482-5486.
50. Green, T., S. F. Heinemann und J. F. Gusella. 1998. Molecular Neurobiology and genetics: investigation of neural function and dysfunction. *Neuron* 20:427-444.
51. Werner, P., E. P. Seward, G. N. Buell und R. A. North. 1997. Domains of P2X receptors involved in desensitization. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 93:15485-15490.
52. Buell, G., C. Lewis, G. Collo, R. A. North und A. Surprenant. 1996. An antagonist-insensitive P_{2x} receptor expressed in epithelia and brain. *EMBO J.* 15:55-62.
53. Rassendren, F., G. Buell, A. Newbolt, R. A. North und A. Surprenant. 1997. Identification of amino acid residues contributing to the pore of a P2X receptor. *EMBO J.* 16:3446-3454.
54. Akabas, M. H., C. Kaufmann, P. Archdeacon und A. Karlin. 1994. Identification of acetylcholine receptor channel-lining residues in the entire M2 segment of the α subunit. *Neuron* 13:919-927.
55. Yu, H., J. K. Chen, S. Feng, D. C. Dalgarno, A. W. Brauer und S. L. Schreiber. 1994. Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains. *Cell* 76:933-945.
56. Jacobson, K. A., B. F. King und G. Burnstock. 2000. Pharmacological characterization of P2 (nucleotide) receptors. *Celltransmissions* 16(3):3-16.
57. Virginio, C., G. Robertson, A. Surprenant und R. A. North. 1998. Trinitrophenyl-substituted nucleotides are potent antagonists selective for P2X₁, P2X₃, and heteromeric P2X_{2/3} receptors. *Mol. Pharmacol.* 53:969-973.
58. Jiang, L.-H., A. B. MacKenzie, R. A. North und A. Surprenant. 2000. Brilliant Blue G selectively blocks ATP-gated rat P2X₇ receptors. *Mol. Pharmacol.* 58:82-88.
59. Soto F., M. Garcia-Guzman, C. Karschin und W. Stühmer. 1996. Cloning and tissue distribution of a novel P2X receptor from rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 223:456-460.
60. Soto F., M. Garcia-Guzman, J. M. Gomez-Hernandez, M. Hollmann, C. Karschin und W. Stühmer. 1996. P2X₄: An ATP-activated ionotropic receptor cloned from rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93:3684-3688.
61. Mulryan, K. D. P. Gitterman, C. J. Lewis, C. Vial, B. J. Leckie, A. L. Cobb, J. E. Brown, E. C. Conley, G. Buell, C. A. Pritchard und R. J. Evans. 2000. Reduced vas deferens contraction and male infertility in mice lacking P2X₁ receptors. *Nature* 403:86-89.
62. Surprenant, A., G. Buell und R. A. North. 1995. P_{2x} receptors bring new structure to ligand-gated ion channels. *Trends Neurosci.* 18:224-229.
63. Schmidt, M. . 1995. Untersuchungen zur Regulation der Aromataseaktivität in Stromazellen des humanen Fettgewebes. Dissertation (Universität Regensburg).
64. Fournet Dulguerov, N., N. J. MacLusky, C. Z. Leranth, R. Todd, C. R. Mendelson, E. R. Simpson und F. Naftolin. 1987. Immunohistochemical localization of aromatase cytochrome P-450 and estradiol dehydrogenase in the syncytiotrophoblast of the human placenta. *J. clin. Endocrinol. Metab.* 65:757-764.

6. Literaturverzeichnis

65. Simmons, D. L., P. A. Lalley und C. B. Kasper. 1985. Chromosomal assignments of gene coding for components of the mixed function oxidase system in mice. *J. Biol. Chem.* 260:515-521.
66. Ackerman, G. E., M. E. Smith, C. R. Mendelson, P. C. MacDonald und E. R. Simpson 1981. Aromatization of androstendione by human adipose tissue stromal cells in monolayer culture. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 53:412-417.
67. Simpson, E. R., G. E. Ackerman, M. E. Smith und C. R. Mendelson. 1981. Estrogen formation in stromal cells of adipose tissue of women: induction by glucocorticosteroids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78:5690-5694.
68. Mendelson, C. R., W. H. Cleland, M. E. Smith und E. R. Simpson. 1982. Regulation of aromatase activity of stromal cells derived from human adipose tissue. *Endocrinology* 111: 1077-1085.
69. Mendelson, C. R., C. J. Corbin, M. E. Smith, J. Smith und E. R. Simpson. 1986. Growth factors suppress and phorbol esters potentiate the action of dibutyryl adenosine 3',5'-monophosphate to stimulate aromatase activity of human adipose stromal cells. *Endocrinology* 118:968-973.
70. Schmidt, M. und G. Löffler. 1994. Induction of aromatase in stromal vascular cells from human breast adipose tissue depends on cortisol and growth factors. *FEBS Lett.* 341:177-181.
71. Dammeier, J. .1996. Charakterisierung eines Purinozeptors aus humanem Fettgewebe. Diplomarbeit (Universität Regensburg).
72. Morley, B. J. und M. J. Walport (Editors). 2000. The complement *factsbook*. Academic Press, San Diego.
73. Reid, K. B. M. und R. R. Porter. Subunit composition and structure of subcomponent C1q of the first component of human complement. 1976. *Biochem. J.* 155:19-23.
74. Perona, J. J. und C. S. Craik. 1995. Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. *Protein Sci.* 4:337-360.
75. Sottrup-Jensen, L., T. M. Stepanik, T. Kristensen, P. B. Lonblad, C. M. Jones, D. M. Wierzbicki, S. Magnusson, H. Dimdey, R. A. Wetsel, A. Lundwall, B. F. Tack und G. H. Fey. 1985. Common evolutionary origin of α_2 -macroglobulin and complement components C3 and C4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:9-13.
76. Müller-Eberhard, H. J. 1988. Molecular organization and function fo the complement system. *Ann. Rev. Biochem.* 57:321-347.
77. Moreley, B. J. und R. D. Campbell. 1984. Internal homologies of the Ba fragment from human complement component Factor B, a class III MHC antigen. *EMBO J.* 3:153-157.
78. Epstein, J., Q. Eichbaum, S. sheriff und R. A. Ezekowitz. 1996. The collectins in innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 8:29-35.
79. Reid, K. B. M. 1986. Activation and control of the complement system. *Essays in Biochem.* 22:27-68.
80. Sim, R. B. und K. B. M. Reid. 1991. C1: molecular interactions with activating systems. *Immunol. Today* 12:307-311.

6. Literaturverzeichnis

81. Ollert, M. W., J. V. Kadlec, K. David, E. C. Petrella, R. Bredehorst und C. W. Vogel. 1994. Antibody-mediated complement activation on nucleated cells. A quantitative analysis of the individual reaction steps. *J. Immunol.* 153:2213-2221.
82. Voet, D. und J. G. Voet. 1992. Molekulare Physiologie. In: *Biochemie* (1. Auflage). Herausgeber der dt. Übersetzung: A. Maelicke und W. Müller-Esterl. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim 1992, 1110-1196.
83. Calcott, M. A. und H. J. Müller-Eberhard. 1972. C1q protein of human complement. *Biochemistry* 11:3443-3450.
84. Matsushita, M. und T. Fujita. 1992. Activation of the classical complement pathway by mannose-binding protein in association with a novel C1s-like serine protease. *J. Exp. Med.* 176:1497-1502.
85. Arlaud, G. J., J. E. Volanakis, N. M. Thielens, S. V. Narayana, V. Rossi und Y. Xu. 1998. The atypical serine proteases of the complement system. *Adv. Immunol.* 69:249-307.
86. Morgan, B. P. und P. Gasque. 1996. Expression of complement in the brain: role in health and disease. *Immunol. Today* 17:461-466.
87. Whaley, K. . 1980. Biosynthesis of the complement components and the regulatory proteins of the alternative complement pathway by human peripheral blood monocytes. *J. Exp. Med.* 151:501-516.
88. Katz, Y., F. S. Cole und R. C. Strunk. 1988. Synergism between gamma interferon and lipopolysaccharide for synthesis of factor B, but not C2, in human fibroblasts. *J. Exp. Med.* 167:1-14.
89. Barnum, S. R., Y. Ishii, A. Agrawal und J. E. Volanakis. 1992. Production and interferon-gamma-mediated regulation of complement component C2 and factors B and D by the astrogloma cell line U105-MG. *Biochem. J.* 287:595-601.
90. Oglesby, T. J., A. Ueda und J. E. Volanakis. 1988. Radioassays for quantitation of intact complement proteins C2 and B in human serum. *J. Immunol. Methods* 110:55-62.
91. Carroll, M. C., R. D. Campbell, D. R. Bentley und R. R. Porter. 1984. A molecular map of the human major histocompatibility complex class III region linking complement genes C4, C2 and factor B. *Nature* 307:237-241.
92. Cox, B. J. und D. M. Robins. 1988. Tissue-specific variation in C4 and Sfp gene regulation. *Nucleic Acids Res.* 16:6857-6870.
93. Campbell, R. D., S. K. Law, K. B. Reid und R. B. Sim. 1988. Structure, organization, and regulation of the complement genes. *Annu. Rev. Immunol.* 6:161-195.
94. Choy, L. N., B. S. Rosen und B. M. Spiegelman. 1992. Adipsin and an endogenous pathway of complement from adipose cells. *J. Biol. Chem.* 267:12736-12741.
95. Cianflone, K. M., A. D. Sniderman, M. J. Walsh, H. T. Vu, J. Gagnon und M. A. Rodriguez. 1989. Purification and characterization of acylation stimulating protein. *J. Biol. Chem.* 264:426-430.
96. Maslowska, M., A. D. Sniderman, R. Germinario und K. Cianflone. 1997. ASP stimulates glucose transport in cultured human adipocytes. *Int. J. Obes.* 21:261-266.

6. Literaturverzeichnis

97. Baldo, A., A. D. Sniderman, S. St-Luce, R. Kohen Avramoglu, M. Maslowska, B. Hoang, J. C. Monge, A. Bell, S. Mulay und K. Cianflone. The adipsin-acylation stimulating protein system and regulation of intracellular triglyceride synthesis. *J. Clin. Invest.* 92:1543-1547.
98. Feilotter, H. E., G. J. Hannon, C. J. Ruddell und D. Beach. 1994. Construction of an improved host strain for two-hybrid screening. *Nucleic Acids Res.* 22:1502-1503.
99. Harper, J. W., G. R. Adami, N. Wei, K. Keyomarsi und S. J. Elledge. 1993. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75:805-816.
100. Vieira J. und J. Messing. 1982. The pUC plasmids, an M23mp7 derived system for insertion of mutagenesis and sequencing with synthetical universal primers. *Gene* 19:259-268.
101. CLONTECH. 1997. Matchmaker GAL4 two-hybrid vectors handbook. (PT3062-1).
102. CLONTECH. 1997. Two-hybrid cDNA library construction kit. User manual (PT1113-1).
103. Wiederer, O. und G. Löffler. 1987. Hormonal regulation of the differentiation of rat adipocyte precursor cells in primary culture. *J. Lipid Res.* 28:649-658.
104. Björntorp, P., M. Karlsson, H. Pertoft, P. Pettersson, L. Sjöström und U. Smith. 1978. Isolation and characterization of cells from rat adipose tissue developing into adipocytes. *J. Lipid Res.* 19:316-324.
105. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
106. Pairault, J. und H. Green. 1979. A study of the adipose conversion of suspended 3T3 cells by using glycerophosphate dehydrogenase as a differentiation marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:5138-5142.
107. Sambrook J., E. F. Fritsch und T. Maniatis. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. CSH Laboratory Press, 2nd Edition, Cold Spring Harbor.
108. CLONTECH. 1996. Yeast protocols handbook (PT3024-1).
109. Hannahan, D. .1983. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166:557-580.
110. Schling, P. . 1999. Untersuchungen zur Existenz und Regulation eines lokalen Renin-Angiotensin-Systems in Zellen aus humanem Fettgewebe. Dissertation (Universität Regensburg).
111. Printen, J. A. und G. F. Jr Sprague. 1994. Protein interactions in the yeast pheromone response pathway: Ste5p interacts with all members of the MAP kinase cascade. *Genetics* 138:609-619.
112. Laemmli, U. K. .1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
113. Blum H., H. Beier und H. J. Gross. 1987. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8:93-99.
114. CLONTECH. 1997. Matchmaker GAL4 two-hybrid user manual (PT3061-1).

6. Literaturverzeichnis

115. Wabitsch, M., R. E. Brenner, I. Melzner, M. Braun, P. Moller, E. Heinze, K. M. Debatin und H. Hauner. 2001. Characterization of a human preadipocyte cell strain with high capacity for adipose differentiation. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 25:8-15.
116. Xing, H., J. P. Northrop, J. R. Grove, K. E. Kilpatrick und G. M. Ringold. 1997. TNF alpha-mediated inhibition and reversal of adipocyte differentiation is accompanied by suppressed expression of PPARgamma without effects on Pref-1 expression. *Endocrinology* 138:2776-2783.
117. Stephens, J. M. und P. H. Pekala. 1991. Transcriptional repression of the GLUT4 and C/EBP genes in 3T3-L1 adipocytes by tumour necrosis factor-alpha. *J. Biol. Chem.* 266:21839-21845.
118. Larouy, D., J. Galitzky und M. Lafontan. 1991. A₁ adenosine receptors in the human fat cell: tissue distribution and regulation of radioligand binding. *Eur. J. Pharmacol.* 206:139-147.
119. Vassaux, G., D. Gaillard, B. Mari, G. Ailhaud und R. Negrel. 1993. Differential expression of adenosine A₁ and A₂ receptors in preadipocytes and adipocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 193:1123-1130.
120. Kunapuli, S. P. und J. L. Daniel. 1998. P₂ receptor subtypes in the cardiovascular system. *Biochem J.* 336:513-523.
121. Reid, K. B. und E. Solomon. 1977. Biosynthesis of the first component of complement by human fibroblasts. *Biochem. J.* 167:647-660.
122. Gasque, P., A. Ischenko, J. Legoedec, C. Mauger, M.-T. Schouff und M. Fontaine. 1993. Expression of the complement classical pathway by human glioma in culture. *J. Biol. Chem.* 268:25068-25077.
123. Legoedec, J., P. Gasque, J.-F. Jeanne, M. Scotte und M. Fontaine. 1997. Complement classical pathway expression by human skeletal myoblasts in vitro. *Mol. Immunol.* 34:735-741.
124. Yasojima, K., C. Schwab, E. G. McGeer und P. L. McGeer. 1998. Human heart generates complement proteins that are upregulated and activated after myocardial infarction. *Circ. Res.* 83:860-869.
125. B. P. Morgan. The complement system: An overview. In: *Methods in Molecular Biology*, Band 150. Herausgeber: B. P. Morgan. Humana Press, Totawa, NJ.
126. Esterbauer, H., F. Krempler, H. Oberkofler und W. Patsch. 1999. The complement system: a pathway linking host defence and adipocyte biology. *Eur. J. Clin. Invest.* 29:653-656.
127. Kappes, A. und G. Löffler. 2000. Influences of ionomycin, dibutyl-cycloAMP und tumour necrosis factor-alpha on intracellular amount and secretion of apM1 in differentiating primary human preadipocytes. *Horm. Metab. Res.* 32:548-554.
128. Cornelius, P., O. A. MacDougald und M. D. Lane. 1994. Regulation of adipocyte development. *Annu. Rev. Nutr.* 14:99-129.
129. Gubler, U. und B. J. Hoffman. 1983. A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene* 25:263-269.

6. Literaturverzeichnis

130. Cole, P. A. und C. H. Robinson. 1990. Conversion of 19-oxo[2 β -2H]androgens into oestrogens by human placental aromatase. An unexpected stereochemical outcome. *Biochem. J.* 268:553-561.
131. Cleland, W. H., C. R. Mendelson und E. R. Simpson. 1985. Effects of aging and obesity on aromatase activity of human adipose cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 60:174-177.
132. Hollopeter, G., H. M. Jantzen, D. Vincent, G. Li, L. England, V. Ramakrishnan, R. B. Yang, P. Nurden, D. Julius und P. B. Conley. 2001. Identification of the platelet ADP receptor targeted by antithrombic drugs. *Nature* 409:202-207.
133. Steppan, C. M., S. T. Bailey, S. Bhat, E. J. Brown, R. R. Banerjee, C. M. Wright, H. R. Patel, R. S. Ahima und M. A. Lazar. 2001. The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409:307-312.

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Die vorgelegte Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt. Ich habe mich bisher noch keinem Promotionsverfahren unterzogen.

Regensburg, den 29.05.2001

Christian Kramheller